

Aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. M. Hannig

**In-situ-Untersuchung der intraoralen bakteriellen
Adhärenz und Biofilmbildung unter dem Einfluss
pasteurisierter *Lactobacillus paracasei* - Bakterien**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

vorgelegt von:

Benjamin Rehage

geb. am 25.06.1980 in Münster

Tag der Promotion:

Dekan: Prof. Dr. M.D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. S. Rupf

2. Berichterstatter:

Meinem Vater und Großvater

Dres. Thomas & Gerhard Rehage

*„Danke, dass ihr mir eure Liebe zur Appolonia zeigtet und
mich stets den respektvollen Umgang mit ihr lehrtet!“*

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1 Zusammenfassung in deutscher Sprache	1
1.2 Abstract.....	2
2 EINLEITUNG	4
2.1 Literaturübersicht.....	5
2.1.1 Der Biofilm	5
2.1.2 Die Karies	10
2.1.3 Probiotika.....	17
2.2 Ziel der Arbeit / Fragestellung.....	18
3 MATERIAL UND METHODE	19
3.1 Versuchsaufbau.....	19
3.2 Studiendesign.....	22
3.2.1 Prüfprodukt	22
3.2.2 Probanden	22
3.2.3 Biofilmgewinnung	22
3.2.4 Versuchsablauf.....	25
3.3 Untersuchungsmethoden.....	26
3.3.1 Plaque- und Gingiva-Indices.....	26
3.3.2 Mikrobiologische Untersuchung.....	28
3.3.3 Fluoreszenzmikroskopie und konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	30
3.3.4 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung.....	31

3.3.5	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	32
3.4	Statistische Auswertung.....	33
3.5	Zusätzliche Versuche.....	34
3.5.1	Wirkung unterschiedlicher Laktobazillenkonzentrationen	34
3.5.2	Repartition der Laktobazillen in der Verum-Zahnpasta	35
3.5.3	Untersuchung des Zahnpasta-Expektorats	35
4	ERGEBNISSE	36
4.1	Auswertung der Plaque- und Gingivaindices	36
4.2	Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung	37
4.2.1	Abklatschpräparate der Prüfkörper	37
4.2.2	Untersuchung der approximalen Plaque	41
4.2.3	Untersuchung des Speichels	45
4.3	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Biofilme	50
4.3.1	Bewertung des Rot-Grün-Verhältnisses	51
4.3.2	Bewertung der Biofilmmenge.....	52
4.4	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Biofilme	58
4.5	Ergebnisse der PCR	60
4.6	Nachuntersuchungen.....	64
4.6.1	Wirkung unterschiedlicher Laktobazillenkonzentrationen	64
4.6.2	Untersuchung des Zahnpasta-Expektorats.....	67
5	DISKUSSION	68
5.1	Diskussion von Material und Methode.....	68
5.1.1	Studiendesign und Fragestellung	68
5.1.2	Art, Herstellung und Bearbeitung der Prüfkörper.....	69

5.1.3	Probandenselektion	70
5.1.4	Biofilmgewinnung	70
5.1.5	Untersuchung des Biofilms	72
5.2	Diskussion der Ergebnisse	75
5.2.1	Plaque- und Gingiva-Indices	75
5.2.2	Fluoreszenzmikroskopie und konfokale Lasermikroskopie	76
5.3	Schlussfolgerung	82
6	LITERATURVERZEICHNIS	84
7	DANKSAGUNG	95
8	LEBENS LAUF	96

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung in deutscher Sprache

In einem Tierexperiment an Ratten konnte eine reduzierte Kolonisierung von *Streptococcus mutans* - Bakterien mit einer daraus resultierenden Abnahme der Kariesaktivität durch den Stamm *Lactobacillus paracasei* DSMZ 16671 festgestellt werden. Grund hierfür ist die Fähigkeit der pasteurisierten *L. paracasei* an *S. mutans* spezifisch zu binden, wodurch eine Bakterienaggregation entsteht, die durch Herunterschlucken oder Ausspülen aus der Mundhöhle eliminiert wird. Im Rahmen der vorliegenden In-situ-Studie sollte zum einen untersucht werden, ob und in welchem Umfang in einer Zahnpasta suspendierte *L. paracasei* DSMZ 16671 die Biofilmbildung durch Adhäsion an die pellikel- bzw. biofilmbedeckte Schmelzoberfläche beeinflussen können, zum anderen, welchen Einfluss sie auf die Speichelkeimzahl von *S. mutans* ausüben. Eine zuvor durchgeführte Studie, in der die Wirkung einer *L. paracasei* enthaltenden Mundspüllösung an sechs Probanden untersucht wurde, zeigte eine leichte Reduktion der Speichelkeimzahl von *S. mutans*. Ein Einfluss auf die Biofilmbildung konnte nicht festgestellt werden. Anhand eines neuen Studiendesigns mit 18 Probanden sollten die Ergebnisse durch Anwendung einer Zahnpasta bestätigt werden.

Bei dieser Studie handelt es sich um eine placebo-kontrollierte Untersuchung im Crossover-Design. Die jeweiligen Zahnpasten (placebo oder verum) wurden über einen Zeitraum von zwei Wochen verwendet. Drei Minuten und 48 Stunden intraoral getragene bovine Schmelzprüfkörper wurden für die Untersuchung der Biofilmbildung genutzt. Die Vitalität der Biofilme wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM), ihre Morphologie mithilfe der Rasterelektronenmikroskopie (REM) untersucht. Hinzu kamen mikrobiologische Analysen in Form von Abklatschpräparaten bzw. Speicheltests auf einem Mitis-Salivarius Agar mit Bacitracin sowie DNA-Analysen durch Anwendung der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), mit denen die Menge an *S. mutans* im Biofilm bzw. im Speichel ermittelt wurde. Sowohl die Vitalität, als auch die morphologische Ausprägung der Biofilme zeigten keinen Unterschied zwischen der *L. paracasei* enthaltenden Zahnpasta und dem Placebo-Produkt. Dies galt auch für die Speichelkeimzahl von *S. mutans*, die nach Anwendung des Placebo- und des Verum-Produktes vergleichbar war. Die Ergebnisse der Untersuchung lassen vermuten, dass die Aggregation der *S. mutans* durch *L. paracasei* am

Menschen entweder gar nicht oder nur in einem geringen Maße funktioniert. Bestimmte Faktoren in der Mundhöhle, die *in vitro* bzw. im Tierexperiment nicht nachgestellt werden können, scheinen die Wirkung der *L. paracasei* zu beeinflussen. Die unterschiedlichen Ergebnisse der Mutans-Streptokokken-Zahl im Speichel könnte auf die ungleiche Teilnehmeranzahl und die verschiedenen Versuchsdesigns der zwei Studien zurückzuführen sein. In beiden Studien konnten jedoch keine negativen Einflüsse der untersuchten Laktobazillen auf die Biofilmbildung entdeckt werden.

1.2 Abstract

An animal experiment demonstrated a decrease in *S. mutans* numbers on the teeth of rats with an associated reduction in caries experience after feeding them with heat-killed *L. paracasei* DSMZ 16671. *L. paracasei* co-aggregates mutans streptococci specifically. By swallowing these bacterial aggregations, the intraoral numbers of *S. mutans* could be reduced considerably. The aim of this *in situ* study was to investigate the adherence of heat-killed *L. paracasei* DSMZ 16671 on pellicle covered enamel surfaces as well as their adherence on matured biofilms. Furthermore, their influence on the amount of mutans streptococci in saliva was analysed. A previous study with only 6 participants showed that rinsing with an *L. paracasei* mouthrinse could slightly reduce the number of *S. mutans* in saliva. The heat-killed bacteria did not have any influence on biofilm formation. In the actual study (18 participants) a toothpaste with *L. paracasei* was analysed to confirm the results of the previous study. The participants brushed their teeth with a placebo or a *L. paracasei* toothpaste for a period of two weeks. Enamel slices of bovine incisors were exposed intraorally for 3 minutes and 48 hours for pellicle and biofilm formation. After investigating the biofilm viability by fluorescence microscopy and confocal laser-scanning-microscopy (CLSM), the biofilm morphology was visualized by scanning-electron-microscopy (SEM), assessing the occurrence of rod-shaped bacteria. To determine the amount of *S. mutans* in the biofilm and in saliva, microbiological analyses (impression preparations of the enamel slabs and saliva samples plated on MSB agar with bacitracin) and the polymerase-chain-reaction (PCR) were performed. The amounts and the viability of biofilms were comparable for *L. paracasei* and placebo toothpastes. The same results were observed when comparing the saliva counts of *S. mutans* after using the *L. paracasei* or placebo product. The dissatisfying results of that study indicate that bacterial aggregation between *L. paracasei* and *S. mutans* has not occurred in a sufficient way or has even

not happened at all. One possible reason may be the occurrence of certain factors in the human oral cavity that influence the effect of the heat-killed lactobacilli. The smaller number of subjects participating in the first study and the differences in the study designs could be possible reasons for the differing *S. mutans* counts in saliva. However, negative effects on biofilm formation could not be observed in either study.

2 Einleitung

Die Zahnkaries, als „alimentär modifizierte, polybakterielle, unspezifische, chronische Infektionserkrankung mit multifaktorieller Genese“ (Kretschmar et al., 2011) zählt heute immer noch, trotz modernster Prophylaxe und Aufklärung sowie perfektionierter Diagnoseverfahren weltweit zu den meist verbreiteten, bakteriellen Infektionskrankheiten (Caglar et al., 2005; Gazzani et al., 2011; Klein et al., 2010). Neben den Faktoren Substrat, Wirt und Zeit ist die Entstehung der Karies an das Vorhandensein eines Biofilms, eine in einer organischen Matrix eingebetteten, strukturierten Bakterienaggregation, gebunden (Bowen und Koo, 2011; Erdem et al., 2012; Roulet, 2003). Insbesondere wird die Besiedlung der Mundhöhle mit dem Keim *Streptococcus mutans* aufgrund seiner pathogenen Eigenschaften mit der Entstehung von Karies in Verbindung gebracht (Loesche, 1986; Sanderink und Weiger, 2004; Tanzer et al., 2001; Van Houte, 1980; Van Houte, 1994).

In den letzten Jahren wurden viele Ansätze verfolgt, um die bereits erwähnten kariesverursachenden Faktoren zu beeinflussen, da erst bei Auftreten aller Faktoren eine Kariesläsion zu erwarten ist (Roulet, 2003). Neben einer richtigen Ernährung zur Reduktion des kariogenen Substrats ist eine regelmäßige Mundhygiene und damit verbunden die Reduktion kariogener Keime essentiell für eine erfolgreiche Kariesprophylaxe.

Eine neuartige Methode, zusätzlich in die bakterielle Flora einzugreifen, besteht in der Verwendung von Probiotika. Hier werden für den Wirtsorganismus harmlose Mikroorganismen eingesetzt, die das Wachstum schädigender Bakterien verhindern beziehungsweise das mikrobielle Ökosystem regulieren können (Cannon, 2011).

In einer Studie von Lang et al. (2010) wurde ein Laktobazillen-Stamm beschrieben, der die Fähigkeit besitzt, *S. mutans* spezifisch zu binden. Auf diese Weise könnten planktonisch im Speichel vorkommende *S. mutans* aggregiert und mit dem Speichel heruntergeschluckt bzw. mit dem zugeführten Medium wieder ausgespuckt werden. Nach erfolgreicher Kariesreduktion im Tierversuch an Ratten (Tanzer et al., 2010) verspricht sich die dentale Forschung durch Verabreichung dieser Bakterien in Mundhygieneartikeln wie Mundspüllösungen, Zahnpasten, Zahnpflegekaugummi etc., die Kariesaktivität beim Menschen zu minimieren. Neben den Vorteilen einer *S. mutans*-Reduktion im Speichel ist jedoch in die Überlegung mit einzubeziehen, dass die pasteurisierten Laktobazillen auch die Fähigkeit besitzen, an die Zahnhart-

substanz bzw. an einen bestehenden Biofilm zu binden, um eine weitere Anlagerung von Mutans-Streptokokken zu begünstigen.

Nach einer bereits durchgeführten Studie, in der die Wirkung einer Mundspüllösung mit pasteurisierten *Lactobacillus paracasei*-Bakterien auf den *in vivo* gebildeten Biofilm untersucht wurde, soll in der vorliegenden Dissertation der Effekt einer Zahnpasta, die den gleichen Bakterienstamm enthielt, analysiert werden.

2.1 Literaturübersicht

2.1.1 Der Biofilm

Allgemeines zu Biofilmen

Nachdem lange Zeit angenommen worden war, dass Bakterien als Einzellebewesen in einem sie ernährenden flüssigen Medium vorkommen, ist heute klar, dass ihre vorherrschende Lebensform der Biofilm ist (Davey und O'toole, 2000; Watnick und Kolter, 2000).

Biofilme sind mit einer Oberfläche verbundene strukturierte Bakteriengemeinschaften, eingebettet in eine extrazelluläre Matrix (Bowen und Koo, 2011). Sie entstehen an den Grenzflächen zweier Phasen, z.B. zwischen Wasser und einer festen Oberfläche. Neben dem Vorhandensein von Grenzflächen ist eine weitere Grundlage für das Entstehen eines Biofilms ein ausreichendes Angebot an Nährstoffen und Wasser. Da diese Voraussetzungen leicht zu erfüllen sind, gelten Biofilme vor allem im medizinisch-technischen Bereich (z.B. Schlauchsysteme zum Transport von Flüssigkeiten) als ein weit verbreitetes Problem (Costerton et al., 1987; Donlan und Costerton, 2002).

Für die Bindung des Biofilms an Oberflächen zeichnen die extrazellulären, polymeren Substanzen (EPS) verantwortlich, die von den Bakterien selbst produziert und anschließend ausgeschieden werden (Flemming und Wingender, 2001a). Sie verleihen dem Biofilm Form und Struktur und sind für dessen physikalische Eigenschaften maßgeblich verantwortlich (Anwar et al., 1992; Bowen und Koo, 2011). Sie bestehen größtenteils aus geladenen oder neutralen Polysacchariden und Proteinen, zu einem geringeren Anteil aus Lipiden und anderen Makromolekülen (Flemming und Wingender, 2001b).

Anwar et al. (1992) stellten fest, dass sich in einem etablierten Biofilm die Stoffwechselaktivität der Organismen je nach Lokalisation verändere. Bakterien der oberen Biofilmschichten

haben einen besseren Zugang zu Sauerstoff und Nährstoffen sowie ein geringeres Problem, ihre Abfallprodukte zu beseitigen. Bakterien in tieferen Schichten haben dagegen ein geringeres Sauerstoff- und Nahrungsangebot. Dies führt dazu, dass sie kleiner sind als die Zellen der oberen Schichten und sich, vom Stoffwechselumsatz aus betrachtet, in einer ruhenden Phase befinden.

Ein Selektionsvorteil von Biofilmen gegenüber planktonisch vorkommenden Bakterien besteht in ihrer Fähigkeit, Nährstoffe zu akkumulieren und wiederzuverwerten in ihrem Schutz gegen äußere Einflüsse sowie im gegenseitigen Austausch von Signalen und Genen (Flemming und Wingender, 2001a; Sanderink und Weber, 2004).

Ein allgemein anerkanntes Modell unterteilt die Entwicklung eines reifen Biofilms in drei Phasen: die initiale Adhäsion von Pionierkeimen auf einer Oberfläche, die Proliferation und die Reifung des Biofilms bis hin zur Freisetzung von Tochterkolonien. In den folgenden Abschnitten soll nun im Detail auf die unterschiedlichen Prozesse der Biofilmbildung eingegangen werden.

Grundvoraussetzung für die orale Biofilmbildung: die Pellikel

Nur wenige Sekunden nach dem Zähneputzen entsteht durch Interaktionen mit der Schmelzoberfläche eine 0,1 - 1µm dicke Schicht aus adsorbierten Proteinen, Glycoproteinen und anderen Makromolekülen, die als Pellikel bezeichnet wird (Hannig und Hannig, 2007; Hojo et al., 2009; Sanderink und Weber, 2004). Der im Folgenden beschriebene Vorgang der Pellikelbildung ist in Abbildung Abb. 2-1 dargestellt.

Da die Zahnoberfläche überwiegend negativ geladen ist, kommt es bei Speichelkontakt zur Ausbildung einer Hydratationsschicht (Stern-Layer, gelb in Abbildung Abb. 2-1), die hauptsächlich aus positiv geladenen Calcium-Ionen besteht (Seemann, 2003). Bestimmte Speichelproteine, sogenannte Pellikel-Präkursoren, die eine hohe Affinität zu dieser Ionenschicht aufweisen, gehen als erste eine Verbindung mit der Zahnhartsubstanz ein. Es handelt sich dabei um Phosphoproteine wie Statherine, Histatine oder prolinreiche Proteine. Außerdem binden in den ersten drei Minuten auch Muzine (MG1 und MG2), Amylase, Cystatine, Lysozym, Carboanhydrasen und Lactoferrin an die Zahnhartsubstanz, sodass davon auszugehen ist, dass neben elektrostatischen Anziehungen auch hydrophobe Wechselwirkungen und Van-der-Waals-Kräfte an der Pellikelbildung beteiligt sind. Die Pellikelbildung erfolgt in zwei Phasen: Nach einer schnellen Besiedlung der Oberfläche durch die ersten Proteine folgt eine langsamere, kontinuierliche Anhaftungsphase von Biomolekülen, die nach 30-90 Minuten ein Pla-

teau in der Wachstumsphase erreicht (Hannig und Hannig, 2009; Hannig und Hannig, 2007; Hannig und Joiner, 2006). Es wird angenommen, dass die treibende Kraft der Pellikelbildung in der Substitution von Wassermolekülen durch Speichelproteine an der Zahnoberfläche besteht, da dies die Reduktion der freien Oberflächenenergie zur Folge hat (Hannig und Joiner, 2006; Vassilakos et al., 1993).

Die Pellikel weist multiple protektive Eigenschaften auf. Sie schützt so im Sinne eines Lubrikants antagonistische Zahnflächen vor Attrition und Abrasion (Berg et al., 2003; Hannig und Hannig, 2007). Aufgrund ihrer semipermeablen Eigenschaften reguliert sie De- und Remineralisationsprozesse, sodass ein Schutz vor Säureangriffen entsteht (Hannig und Hannig, 2007). Auch antibakterielle Eigenschaften werden der Pellikel durch Speichelkomponenten wie IgA, Lactoferrin, Lysozym, Carboanhydrase I und II zugeschrieben (Deimling et al., 2007; Hannig et al., 2005; Hannig et al., 2009). Neben den zuvor angeführten protektiven Komponenten ist die Pellikel Ausgangspunkt der Biofilmbildung. Sogenannte Pionierkeime, wie z.B. *S. oralis* oder *S. sanguis*, haben die Fähigkeit, über stereochemische Wechselwirkungen irreversibel an Pellikelstrukturen wie Amylase, prolinreiche Proteine, Muzine, Fibrinogen und Lysozym zu binden (Douglas, 1994; Hannig und Joiner, 2006; Hojo et al., 2009; Lee et al., 2011) und bieten die Grundlage für die weitere Adhärenz von Bakterien. Ein weiterer Nachteil besteht in der Einlagerung von Farbstoffen oder denaturierenden Agenzien wie Chlorhexidin in die Pellikel, was zu Verfärbungen von Zähnen und Restaurationen führen kann (Hannig und Joiner, 2006).

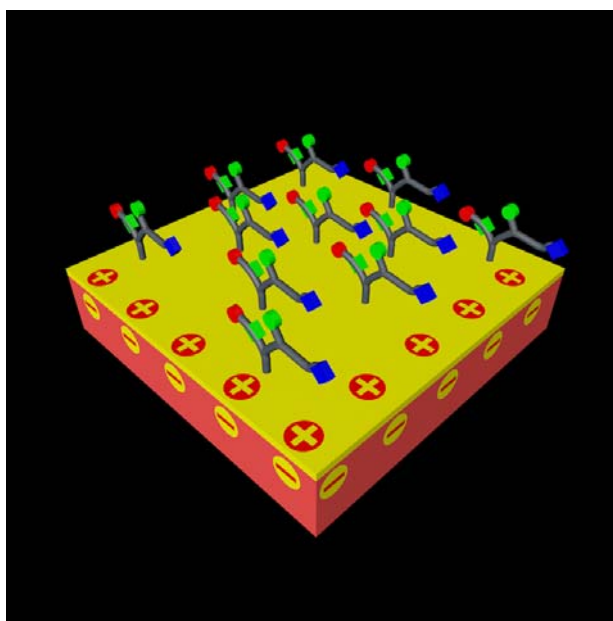


Abb. 2-1 Zahnoberfläche mit Pellikelschicht

Die initiale Adhäsion

Der erste Kontakt von Mikroorganismen mit der Zahnhartsubstanz, der entweder passiv über Brownsche Bewegung oder aktiv über chemotaktische Aktivität der planktonischen Bakterien erfolgt, ist eher zufälliger Natur (Quirynen, 1994). Diese im Folgenden beschriebene Anbindung der Pionierkeime an die Pellikel ist in Abbildung Abb. 2-2 (lila) dargestellt.

Bei einer Annäherung des Bakteriums an die Zahnhartsubstanz kommt es ab einer Entfernung von ca. 50 µm über Van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen zur Ausbildung einer reversiblen, schwachen Bindung (Douglas, 1994; Quirynen, 1994). Um die Oberfläche dauerhaft besiedeln zu können, sind zusätzlich irreversible Mechanismen notwendig. Die meisten Bakterien besitzen eine Umhüllung aus Glykoproteinen, die Glykokalyx. In dieser lokalisiert, befinden sich Anheftungsstrukturen, sogenannte Adhäsine, mit denen sie an bestimmte Bestandteile der Pellikel, z.B. prolinreiche Proteine binden können. Manche dieser Adhäsine, die als Lektine bezeichnet werden, erkennen Kohlenhydratstrukturen wie Galaktosidverbindungen der Pellikel und gehen mit diesen über eine Liganden-Rezeptor-Reaktion eine feste Verbindung ein (Douglas, 1994; Folwaczny und Hickel, 2003; Gängler und Arnold, 2005).

Streptokokken der Mutans-Gruppe sind darüber hinaus in der Lage, ein alpha 1,3-Glycanmolekül auf die Oberfläche zu sezernieren, das Mikroorganismen zusätzlich die Bindung an die Zahnoberfläche erleichtert (Folwaczny und Hickel, 2003; Rosan und Lamont, 2000; Vickerman et al., 1991).

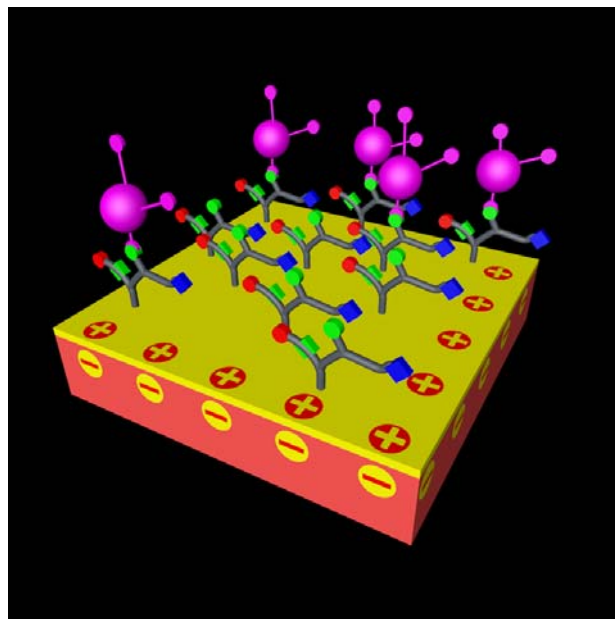


Abb. 2-2 Initiale Kolonisierer (Pionierkeime) binden an die Pellikel

Proliferation

Nach der initialen Anheftung erfolgt die Ausreifung des Biofilms durch Bindung neuer Bakterienarten an die Pionierkeime. Dieser Vorgang, der über mehrere Wochen andauern kann (Rosan und Lamont, 2000), funktioniert über Koadhäsions- (Bindung zwei genetisch identischer Bakterien) bzw. über Koaggregationsmechanismen (Bindung zwei genetisch unterschiedlicher Bakterien) (Foster und Kolenbrander, 2004; Hojo et al., 2009; Sanderink und Weber, 2004) und wird in Abbildung Abb. 2-3 gezeigt. Auch hier spielt, wie schon bei der primären Besiedlung, die adhäsionvermittelte Bindung eine wichtige Rolle (Kolenbrander und London, 1993). Bei der Koaggregation binden die Mikroorganismen entweder direkt an die Zelloberfläche der vorhandenen Bakterien oder nutzen die Zwischenschaltung speziesfremder Bakterien, was als „bridging“ bezeichnet wird (Folwaczny und Hickel, 2003; Jenkinson und Lamont, 1997). Durch Verstoffwechselung des Substrats (vornehmlich niedermolekulare Kohlenhydrate) bilden kariogene Streptokokken, Laktobazillen und Actinomyceten extrazelluläre (EPS) und intrazelluläre (IPS) Polysaccharide. Die EPS bilden neben Speichelglycoproteinen den Hauptbestandteil der organischen Matrix und unterstützen, wie schon bei der initialen Adhäsion den Vorgang der Koaggregation. Sie dienen als Gerüst des Biofilms sowie als Nahrungsspeicher für die Mikroorganismen (Koo et al., 2009; Lingström et al., 2000; Sanderink und Weber, 2004). In der frühen Phase der Biofilmreifung (< 6h) bilden sich Mikrokolonien aus, in denen die Bakterien in engem Kontakt zueinander stehen, ohne von großen Mengen extrazellulärer Matrixmoleküle umgeben zu sein. Dies ermöglicht einen effektiven Genaustausch zwischen den einzelnen Bakterien, der für die Ausreifung des Biofilms eine wichtige Rolle spielt (Folwaczny und Hickel, 2003). Zur Anpassung des Biofilms an Umweltbedingungen ist ein Informationsaustausch zwischen den Bakterien von großer Bedeutung. Dieser Mechanismus, bei dem Signalmoleküle zwischen den Mikroorganismen ausgetauscht werden, wird als „quorum sensing“ bezeichnet (Lazar, 2011; Miller und Bassler, 2001; Sanderink et al., 2008). Kommt es zu einem Anstieg der Signalmoleküle über einen bestimmten Schwellenwert hinaus, führt dies zur Transkription spezifischer Genprodukte und auf diese Weise zur Änderung der phänotypischen Funktion der Bakterien (Folwaczny und Hickel, 2003).

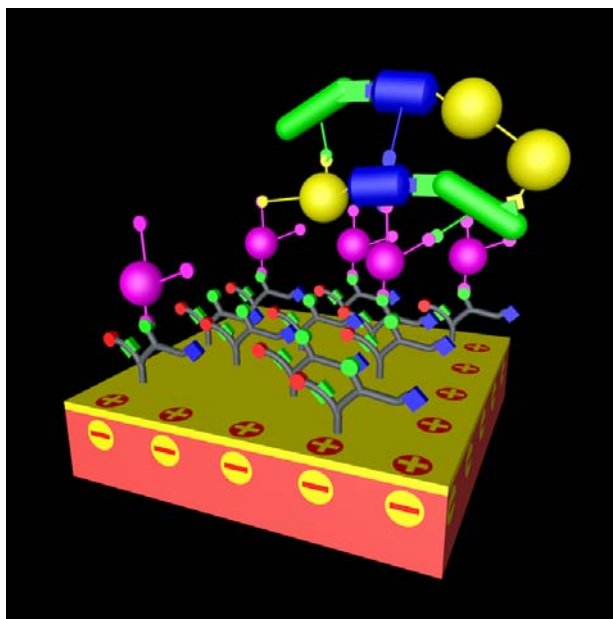


Abb. 2-3 Koadhäsion und Koaggregation mit weiteren Keimen – Reifung des Biofilms

Reifung des oralen Biofilms

Bis zum vierten Tag besteht der Biofilm zum großen Teil aus grampositiven Kokken. Nach und nach gesellen sich grampositive und gramnegative Stäbchen und zuletzt auch Spirochäten hinzu. Im Laufe der Zeit dominiert die anaerobe Komponente des Biofilms (Loe et al., 1965).

Durch Erosion und Abschilferung erfolgt nach der Ausreifung des Biofilms die Freisetzung von Tochterkolonien. Dieser Vorgang bietet den Bakterien die Möglichkeit, im Schutze der bakteriellen Gemeinschaft neue Oberflächen zu besiedeln. Auch dieser Prozess, bei dem eine enzymatische Durchtrennung der Matrix um die Tochterkolonie herum erforderlich ist, wird genetisch und über einen Informationsaustausch (quorum sensing) reguliert (Folwaczny und Hickel, 2003).

2.1.2 Die Karies

Definition

Unter Zahnkaries wird ein durch Bakterien verursachter Demineralisationsprozess von Schmelz und Dentin verstanden, der bei progredientem Fortschritt zu irreversiblen Zahnhartsubstanzverlust führt (Gängler et al., 2005). Sie stellt die häufigste Erkrankung des Zahnhartgewebes dar und weist wie andere Erkrankungen auch Phasen der Stagnation, Remission oder Progression auf (Klimek und Hellwig, 1999).

Ätiologie

Die ersten wissenschaftlich fundierten Untersuchungen zur Kariesätiologie gehen auf die **chemoparasitäre Theorie** von Miller (1892) zurück, die später durch die Wissenschaftler Keyes (1968) und König (1971) ergänzt wurden.

Nach diesem Modell kann eine Karies nur beim Vorliegen von vier obligatorischen Faktoren entstehen:

- azidogene Mikroorganismen
- Verfügbarkeit von Substrat
- Zeit
- Wirt

Azidogene Mikroorganismen (Plaque) bilden bei einem Überangebot an kariogenen, niedermolekularen Kohlenhydraten (Substrat) organische Säuren, die bei langer und häufiger Einwirkung (Zeit) auf die Zahnhartsubstanz (Wirt) zu einer Demineralisation führen (Hellwig et al., 2006b; Roulet, 2003; Sanderink und Weiger, 2004). Sobald auch nur einer dieser Faktoren fehlt, kommt es zu keiner Kariesausbildung (Roulet, 2003).

Neben den vier Hauptfaktoren spielen Sekundärfaktoren wie Speichelfluss, Zusammensetzung des Speichels, Ernährungsgewohnheiten, Morphologie der Zähne und die individuelle Mundhygiene eine entscheidende Rolle bei der Kariesentstehung (Hellwig et al., 2006b; Klimek und Hellwig, 1999).

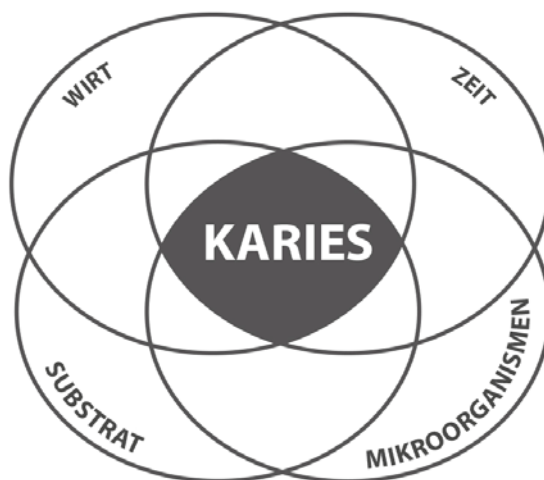


Abb. 2-4 Die vier Grundvoraussetzungen für die Entstehung der Karies

Neben der zuvor erwähnten chemoparasitären Theorie wurden in den darauffolgenden Jahren weitere Hypothesen zur Kariesätiologie vorgestellt. Eine davon ist die **spezifische Plaquehypothese** von Loesche (1976), bei der davon ausgegangen wird, dass die Karies nur durch bestimmte Mikroorganismen der Plaque, wie *S. mutans*, *S. sobrinus* und Laktobazillen, im Sinne einer Infektion verursacht wird (Emilson und Krasse, 1985; Marsh und Martin, 2003b; Van Houte, 1980). Die Pathogenität der Plaque soll dabei von der Konzentration dieser verantwortlichen Mikroorganismen abhängig sein. Die Hypothese scheint allerdings nicht vollständig gesichert, da es Patienten gibt, die trotz hoher Kariesaktivität nur geringe Mengen an *S. mutans* aufweisen (Marsh und Martin, 2003b; Masuda et al., 1979). Umgekehrt korreliert eine hohe Mutanzahl nicht zwangsläufig mit der Entwicklung einer Karies (Eschrich et al., 2003; Peralisi et al., 2010).

Bei der **unspezifischen Plaquehypothese** ist davon auszugehen, dass die Quantität und nicht die Qualität der Plaque für das Entstehen einer Karies verantwortlich ist (Marsh und Martin, 2003b). Erst bei ausreichenden Plaquemengen können die Wirtsabwehrfaktoren die kariesverursachenden Prozesse nicht mehr kompensieren. Die Theorie berücksichtigt, dass die Pathogenität des Biofilms erst durch die Interaktionen und Kommunikationen der einzelnen Mitglieder der bakteriellen Gemeinschaft entsteht. Die Entfernung der Plaque durch Zähneputzen stellt daher bei dieser Hypothese die einzig sinnvolle Kariesprävention dar (Kleinberg, 2002).

Marsh (1994) vereinte die zwei Hauptelemente der beiden zuvor genannten Hypothesen und formulierte daraus die **ökologische Plaquehypothese**. Er geht davon aus, dass in dentalen Plaques ständig kariogene Bakterien in relativ geringen Mengen anzutreffen sind. Solange ein neutraler pH-Wert vorliegt und wenig kariogenes Substrat zur Verfügung steht, überwiegen andere Mikroorganismen, wie z.B. non-mutans Streptokokken und Actinomyceten. In diesem Zustand befinden sich De- und Remineralisation im Gleichgewicht. Kommt es jedoch zu einem Anstieg an kariogenen Substanzen, wird über die Glykolyse vermehrt Säure produziert, sodass es innerhalb der Plaque zu einem pH-Abfall kommt. Es folgt ein ökologischer Shift durch die Vermehrung azidurer und azidogener Mikroorganismen wie Mutans-Streptokokken oder Laktobazillen, wodurch der pH-Wert noch weiter sinkt (Eschrich et al., 2003; Marsh, 1994; Paes Leme et al., 2006). In diesem Zustand verschiebt sich das Gleichgewicht deutlich in Richtung Demineralisation.

In der kürzlich vorgestellten **erweiterten ökologischen Plaquehypothese** wird vermutet, dass non-mutans Streptokokken und Actinomyceten bei einem bestehenden pH-Abfall das ökolo-

gische Gleichgewicht nicht mehr aufrechterhalten, sondern, im Gegenteil, durch phänotypische und genotypische Veränderungen die Demineralisation sogar fördern können. Der pH-Abfall bewirkt eine Steigerung ihres ansonsten schwach ausgeprägten aziduren und azidogenen Verhaltens. Bleibt das saure Milieu über längere Zeit bestehen, ersetzen stärkere Säurebildner wie Mutans-Streptokokken und Laktobazillen die Non-Mutans-Streptokokken und Actinomyceten, was den Prozess der Kariesentstehung beschleunigt (Takahashi und Nyvad, 2008).

Nach dieser Hypothese ist die treibende Kraft für die Kariesentstehung eine dauerhafte Zufuhr von Kohlenhydraten mit der daraus resultierenden Störung des ökologischen Gleichgewichts (Van Houte, 1994). Präventionsmaßnahmen, die sich daraus ableiten lassen sind demnach eine Reduktion des Zuckerkonsums und die Anregung des Speichelflusses (Marsh, 1994).

Demineralisation der Zahnhartsubstanz

Die Bakterien des Biofilms, überwiegend Streptokokken und Actinomyceten, sind in der Lage Nahrungskohlenhydrate wie Saccharose über die Glykolyse zu organischen Säuren wie Laktat, Formiat, Butyrat, Acetat, Propionat zu verstoffwechseln. Die Säureproduktion führt dabei zu einem lokalen Abfall des pH-Wertes unter 5, der mit einer Demineralisation der Zahnhartsubstanz einhergeht (Van Houte, 1980). Die unten dargestellte Stephan-Miller-Kurve zeigt den typischen Verlauf des pH-Wertes in der Mundhöhle nach Spülung mit einer 10%igen Glukoselösung. Bereits nach 10 Minuten sinkt der pH-Wert in den kritischen Bereich unter 5. Erst nach 30-60 Minuten zeigen die Speichel- und Plaquepuffer ihre Wirkung und neutralisieren das Mundhöhlenmilieu. Überwiegt der Prozess der Demineralisation, so kommt es zu oberflächlichen Schädigungen der Zahnhartsubstanz und zur Ausbildung einer Karies (Hellwig et al., 2006b; Matsui und Cvitkovitch, 2010; Sanderink und Weiger, 2004).

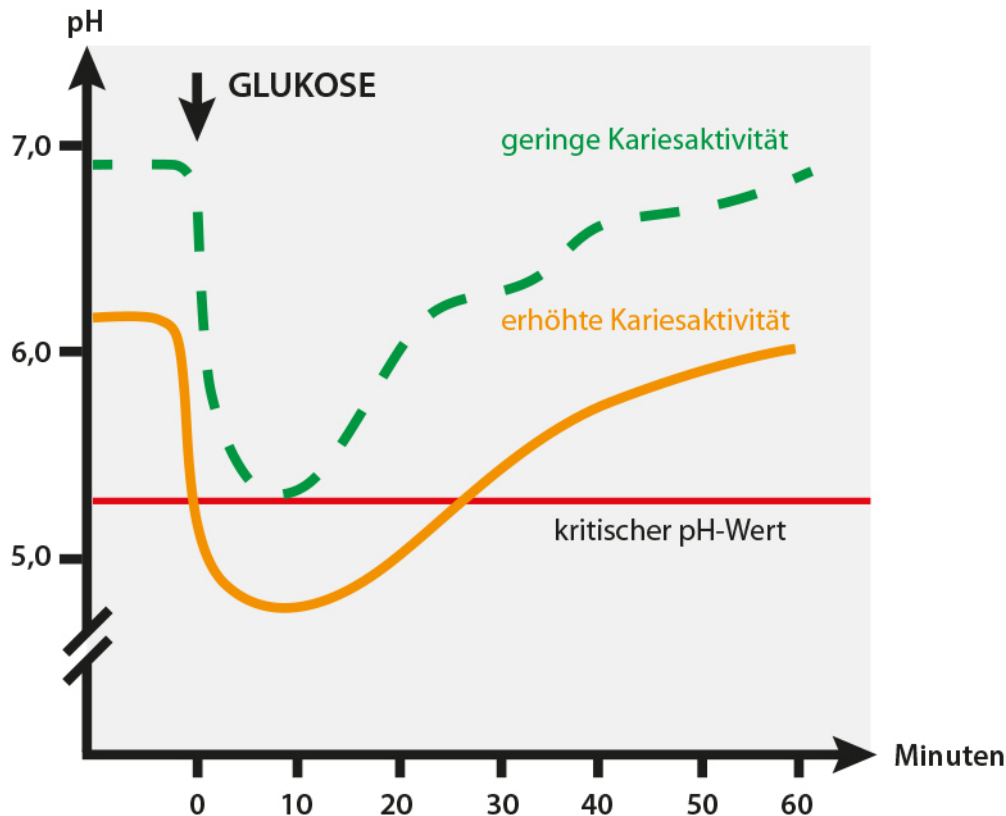


Abb. 2-5 Stephan - Miller - Kurve (Abhängigkeit des pH-Abfalls vom Nahrungsangebot)

Die erste klinisch erkennbare Veränderung der Zahnhartsubstanz tritt als weißlich opake Verfärbung, auch „white spot“ genannt, auf (Kidd und Fejerskov, 2004). Diese noch auf den Schmelz begrenzte Demineralisation ist durch eine intakte Oberfläche gekennzeichnet. Anhand lichtmikroskopischer und polarisationsmikroskopischer Untersuchungen an Dünnschliffen wird die Schmelzkaries in vier Zonen eingeteilt (Arnold et al., 1998). Die transluzente Zone weist ein Porenvolumen von 1% auf im Vergleich zu gesundem Schmelz mit einem Porenvolumen von 0,1%. Sie entsteht durch das Herauslösen leicht säurelöslichen Karbonats aus dem Apatitgitter. Die darauf folgende dunkle Zone zeigt ein Porenvolumen von 2-4 % auf. Durch Remineralisationsprozesse sind die Poren jedoch kleiner als die der transluzenten Zone. Auf den Läsionskörper, der mit 5-25% das größte Porenvolumen und damit verbunden den größten Mineralverlust aufweist, folgt schließlich die superfizielle Zone. Im Polarisationsmikroskop erscheint diese Schicht mit einem Porenvolumen von weniger als 5% nahezu intakt (Arnold et al., 1998). Sie ist das Ergebnis der Remineralisationsvorgänge des Speichels in Folge der Säureangriffe (Gängler et al., 2005; Hellwig et al., 2006b).

Schreitet die Karies weiter fort, so erreicht sie nach einer gewissen Zeit das Dentin, wo sie sich entlang der Dentinkanälchen ausbreitet. Als Reaktion auf bakterielle Toxine oder Enzy-

me wird die Produktion von Reizdentin angeregt. Die Dentinkaries wird in eine frühe Läsion mit partiellem Verlust vitaler Odontoblastenfortsätze und Hypermineralisation der peripheren Tubuli-Abschnitte sowie in eine fortgeschrittene Läsion mit bestehender Kavitation und Penetration von Bakterien eingeteilt. Den vier Zonen der Schmelzkaries folgen bei der frühen Dentinläsion weitere vier Zonen.

Die Totzone besteht aus verödeten, luftgefüllten Dentintubuli (dead tracts). Kennzeichen der darauf folgenden Transparenzzone sind die peri- und intratubuläre Mineralisation (Dentinsklerose). Dem schließen sich die Zone des normalen Dentins mit intakten Odontoblastenfortsätzen sowie die Zone des Reizdentins an. Nach Kavitation des Schmelzes und einer massiven Invasion von Bakterien entsteht die fortgeschrittene Läsion, die wiederum in 6 Zonen eingeteilt wird:

Zone 1: Erweichung und Verflüssigung (erweichtes Dentin), Zone 2: Demineralisation durch Laktobazillen und andere azidogene Keime, Zone 3: Frontkeime, Zone 4: Trübung, Zone 5: Transparenz, Zone 6: Reizdentin.

Kariogene Mikroorganismen

An der Entstehung der Karies sind verschiedene Mikroorganismen beteiligt, die im Folgenden beschrieben werden. Mutans-Streptokokken werden als bedeutende Verursacher der Karies angesehen (Jordan et al., 1987; Sanderink und Weiger, 2004; Tanzer et al., 2001). Es handelt sich um grampositive Bakterien, die erst nach Durchbruch des ersten Milchzahns in der Mundhöhle des Menschen nachweisbar sind (Masuda et al., 1979). Ihren Namen verdanken sie der Fähigkeit, je nach metabolischem Aktivierungsgrad von der Stäbchen- in die Kokkenform *mutieren* zu können (Gängler et al., 2005; Marsh und Martin, 2003a; Sanderink und Weiger, 2004). Es werden aufgrund verschiedener Kohlenhydratantigene in der Zellwand der Bakterien sieben verschiedene Arten von Mutans-Streptokokken unterschieden. Der häufigste aus der Zahnplaque isolierte Vertreter dieser Gruppe ist *S. mutans* mit seinen drei Serotypen (c, e und f). *S. sobrinus* (Serotypen d und g), *S. rattus*, *S. ferus*, *S. macacae* und *S. downei* stellen weitere Mutans-Streptokokkenarten dar (Marsh und Martin, 2003a).

Mehrere Virulenzfaktoren sind für die hohe Kariogenität von *S. mutans* verantwortlich:

- Mithilfe des Enzyms Glykosyltransferase lassen sich langkettige Polysaccharide aus niedermolekularen Kohlenhydraten synthetisieren. Eine wichtige Rolle bei der Kariesentstehung spielen dabei die unlöslichen extrazellulären Polysaccharide (Glukane bzw. Mutane). Sie führen dazu, dass die Bakterien fest an der Zahnoberfläche adhäre-

ren können, und verleihen dem Biofilm die nötige Klebrigkeit und Struktur (Flemming und Wingender, 2001b; Flemming und Wingender, 2010). Einen Teil der langkettigen Polysaccharide speichern die Bakterien intrazellulär in Glykogen-Form (IPS, intrazelluläre Polysaccharide), sodass sie bei geringem Substratangebot darauf zurückgreifen können (Hellwig et al., 2006b; Paes Leme et al., 2006; Sanderink und Weiger, 2004).

- *S. mutans* weisen azidogene Eigenschaften auf, indem sie niedermolekulare Kohlenhydrate über die Glykolyse zu Säuren (i. d. R. Laktat) verstoffwechseln. Diese Säuren führen zur Demineralisation der Zahnhartsubstanz (Gängler et al., 2005; Hellwig et al., 2006b; Sanderink und Weiger, 2004; Van Houte, 1994).
- Ein wichtiger Selektionsvorteil gegenüber anderen Bakterienarten ist ihr azidures Verhalten. Sie sind auch bei einem pH-Wert unter 4 immer noch in der Lage, sich zu vermehren (Gängler et al., 2005; Hellwig et al., 2006b; Sanderink und Weiger, 2004; Van Houte, 1994).

Als weitere am Kariesprozess maßgeblich beteiligte Mikroorganismen sind *Lactobacillus spp.* und *Actinomyces spp.* zu benennen. Laktobazillen sind ubiquitär in der Mundhöhle verbreitete Mikroorganismen, die bereits im 1. Lebensjahr in der Mundhöhle auftreten. Die häufigsten *Lactobacillus*-Spezies sind *L. paracasei*, *L. fermentum* und *L. acidophilus*. Im Gegensatz zu *Mutans*-Streptokokken kommen sie hauptsächlich in fortgeschrittenen Dentinläsionen vor (Caglar et al., 2005; Gängler et al., 2005; Sanderink und Weiger, 2004; Van Houte, 1994). Auch sie weisen ein azidogenes und azidures Verhalten auf und sind mit einem leistungsfähigen Phosphotranspherase-System ausgestattet (Sanderink und Weiger, 2004).

In Anlehnung an die *Lactobacillus spp.* zählen Azidogenität, Azidurie und ein effektives Phosphotranspherase-System zu den Virulenzfaktoren der Aktinomyzeten (Sanderink und Weiger, 2004). Sie werden hauptsächlich mit der Karies des Wurzeldentins in Verbindung gebracht. An der Entstehung der Schmelzkaries sind sie weniger beteiligt (Gängler et al., 2005). Aufgrund ihrer Fähigkeit, den Biofilm durch die Produktion von Urease zu „alkalisieren“, werden diesen Bakterien sogar zu einem gewissen Grad auch kariesprotektive Eigenschaften zugesprochen. Auch andere Spezies können am Kariesprozess beteiligt sein, z.B. *Neisseria*-, *Bacteroides*-, *Bifidobacterium*-, *Clostridium*-, *Eubacterium*- *Propionibacterium*- und *Rothia*-Stämme (Sanderink und Weiger, 2004).

2.1.3 Probiotika

Probiotika sind „lebende Mikroorganismen, die eine positive Wirkung auf die Gesundheit des Wirts ausüben, wenn sie in ausreichender Menge verabreicht werden“ (FAO/WHO, 2002). Der Name leitet sich aus dem griechischen „pro bios – für das Leben“ ab (Gibson und Fuller, 2000; Rastogi et al., 2011).

Die Erforschung der Probiotika geht bereits auf das Jahr 1905 zurück, als der Biologe und Nobelpreisträger Elie Metchnikoff einen Bakterienstamm, *Lactobacillus bulgaricus*, entdeckte, der bei regelmäßigem Verzehr einen günstigen Einfluss auf die Darmflora ausübte (Cannon, 2011; Meurman, 2005). Das so entstandene Konzept der Probiotika wurde in den letzten Jahrzehnten weiterverfolgt. So fanden vermehrt Joghurts und fermentierte Milchprodukte, aber auch Nahrungsergänzungsmittel und pharmazeutische Präparate mit probiotischen Mikroorganismen zur Behandlung und Prophylaxe intestinaler und extraintestinaler Erkrankungen Eingang in den Lebensmittelmarkt. Insbesondere Laktobazillen und Bifidobakterien werden probiotische Eigenschaften zugesprochen (Stamatova und Meurman, 2009) und finden bis heute den häufigsten Einsatz (Gibson und Fuller, 2000; Rastogi et al., 2011).

Der Grundgedanke bei der Anwendung von Probiotika ist der, dass harmlose Mikroorganismen solche Lebensräume kolonisieren, die andererseits durch pathogene Keime besetzt würden (Twetman und Stechsen-Blicks, 2008). Probiotika üben ihre Wirkung auf unterschiedliche Art und Weise aus. Ein möglicher Wirkmechanismus ist die Konkurrenz der probiotischen Bakterien und der pathogenen Keime um Bindungsstellen (z.B. Mukosa des Darms) oder um das Substratangebot. Einige Probiotika sind in der Lage, antimikrobielle Substanzen zu produzieren, die anderen Bakterien schaden. Auch die Regulierung der mukosalen Permeabilität ist eine Wirkung, die Probiotika zugesprochen wird (Bonifait et al., 2009; Meurman, 2005; Rastogi et al., 2011).

Probiotika in der Zahnmedizin

Nachdem sich die Anwendung von Probiotika zur Unterstützung der Darmflora bereits etabliert hatte (Bonifait et al., 2009; Burton et al., 2011; Stamatova und Meurman, 2009; Twetman und Keller, 2012), richtete auch die Dentalforschung in den letzten Jahren ihr Augenmerk vermehrt auf den Einsatz probiotischer Bakterien zur Bekämpfung oraler Erkrankungen. Da die Mundhöhle die Pforte des Gastrointestinaltraktes darstellt, wird davon ausgegangen, dass die meisten Wirkmechanismen, die sich bereits im Darm als erfolgreich erwiesen haben, auch oral anwendbar sind (Cannon, 2011; Twetman und Keller, 2012).

Es werden verschiedene Wirkmechanismen der Probiotika in der Mundhöhle angenommen, die aber bislang nicht alle nachgewiesen werden konnten. Zum einen sollen Probiotika die Biofilmbildung durch Beeinflussung der bakteriellen Adhäsion an Proteinen (Haukioja et al., 2008) bzw. an anderen Bakterien regulieren können (Meurman und Stamatova, 2007; Rastogi et al., 2011). In einer In-vitro-Studie von Haukioja et al. (2008) waren probiotische Bakterien in der Lage, die Adhärenz von *S. mutans* an Rezeptoren spezifisch zu verhindern, indem sie die Zusammensetzung der Pellikel modifizierten. Auch die Konkurrenz um das Substratangebot sowie die Bildung von antimikrobiellen Substanzen werden als mögliche Wirkmechanismen gesehen. Eine indirekte Wirkung der Probiotika auf pathogene Keime kann durch Modulation der systemischen und lokalen Immunantwort erzielt werden (Meurman und Stamatova, 2007). Bislang existieren nur wenige klinische Studien, die sich mit diesem Thema befassen. Näse et al. (2001) fanden in einer placebokontrollierten Studie heraus, dass die regelmäßige Einnahme einer probiotischen, Laktobazillen enthaltenden Milch zu einer Reduktion des Kariesrisikos bei Kindergarten-Kindern führte. Eine andere Studie an 74 jungen Erwachsenen konnte die Reduktion der *S. mutans*-Anzahl im Speichel nach 3-wöchigem Verzehr von *L. rhamnosus* enthaltendem Käse nachweisen (Ahola et al., 2002). Auch durch einen *L. reuteri* enthaltenden Joghurt konnte eine Reduktion von *S. mutans* nachgewiesen werden (Nikawa et al., 2004).

2.2 Ziel der Arbeit / Fragestellung

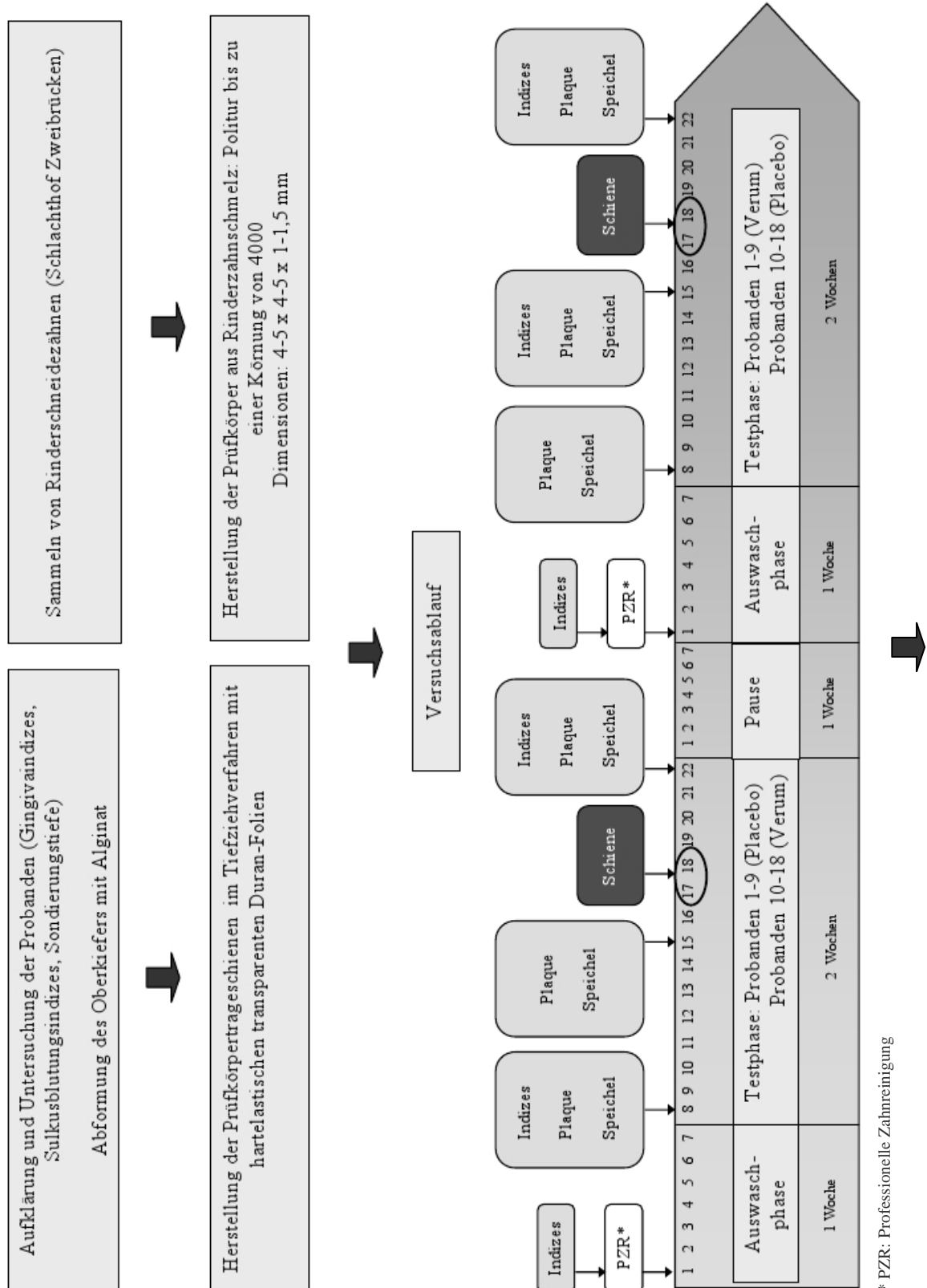
Im Rahmen der vorliegenden In-situ-Studie sollte untersucht werden, ob und in welchem Umfang pasteurisierte *Lactobacillus paracasei*-Bakterien die Fähigkeit besitzen, an der initialen Pellikelschicht bzw. an einen präexistierenden Biofilm (48 h) zu adhären. Ferner ist ein möglicher Einfluss auf die Biofilmmorphologie Gegenstand der Untersuchung.

Um zu überprüfen, ob *S. mutans*-Bakterien durch die *L. paracasei* agglutiniert werden, wurde mithilfe eines Speicheltests die Anzahl der *S. mutans* im Speichel bestimmt.

In einer vorangegangenen Studie, in der die Wirkung einer *L. paracasei* enthaltenden Mundspüllösung untersucht wurde, ließ sich eine geringfügige Reduktion des Keims *S. mutans* im Speichel nachweisen. Einen Einfluss auf die Biofilmbildung durch die Laktobazillen zeigte sich nicht. Anhand eines neuen Studiendesigns sollten durch die Anwendung einer Laktobazillen enthaltenden Zahnpasta die bereits durchgeführten Untersuchungen weiter vertieft werden.

3 Material und Methode

3.1 Versuchsaufbau



Analyseverfahren



Plaque- und Gingivaindizes (PCR / mSBI)

Bewertung der Plaquemenge und des Entzündungsgrades der Gingiva im Verlauf des Experiments

1. vor der PZR (Ausgangssituation)
2. nach der Auswaschphase (1 Woche nach PZR)
3. nach der Testphase (Situation nach 2 Wochen Putzen mit Placebo- bzw. Verum-Zahnpasta)

Mikrobiologische Untersuchung (Karies-Risiko-Test = CRT)

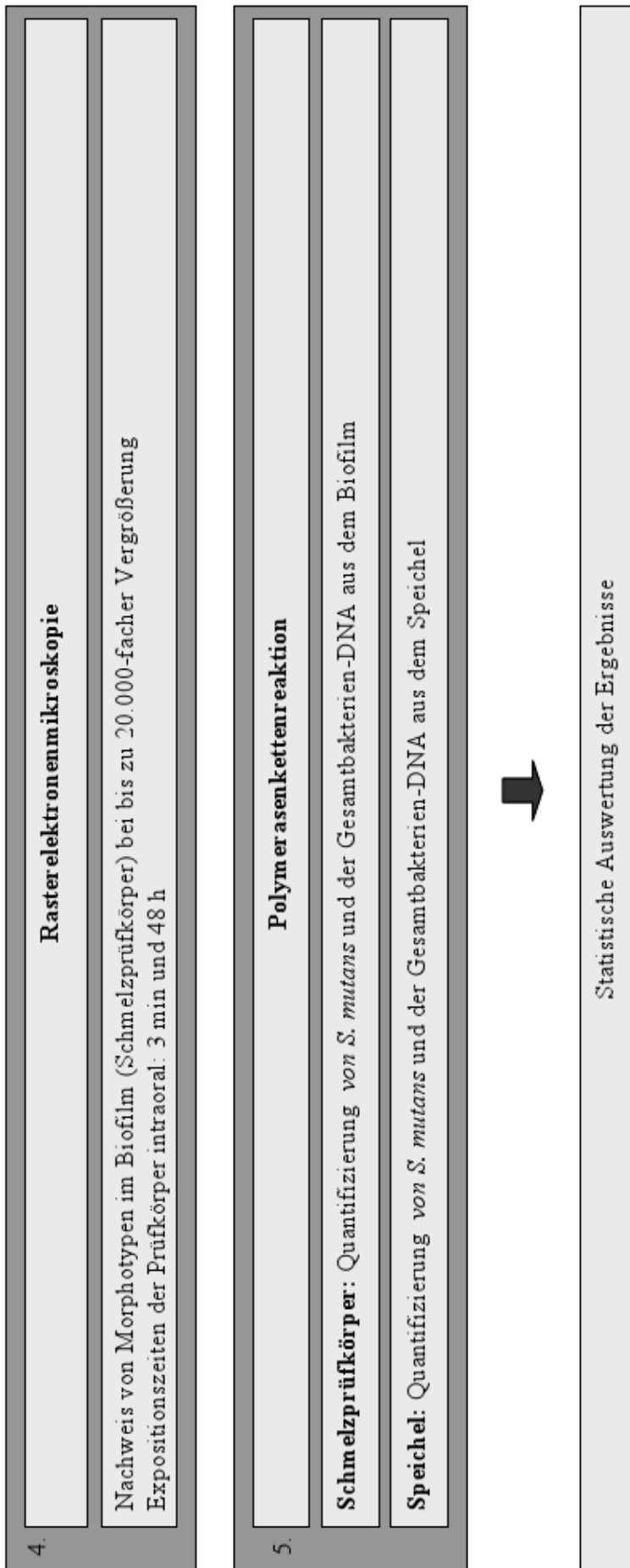
Schmelzprüfkörper: Abklatschpräparate der Prüfkörper auf Mitis-Salivarius-Agar mit Bacitracin (Expositionszeiten: 3 min und 48 h)
→ Nachweis von *S. mutans* im Biofilm

Plaque: Ausstreichen approximaler Plaque (zwischen den Zähnen 16 und 15) auf Mitis-Salivarius-Agar mit Bacitracin
→ Nachweis von *S. mutans* in interdentaler Plaque

Speichel: Kultivierung von *S. mutans* aus dem Speichel auf Mitis-Salivarius-Agar mit Bacitracin nach Stimulation durch Paraffinkauen

Fluoreszenzmikroskopie / Konfokale-Lasermikroskopie (CLSM)

Bestimmung der Anzahl bzw. Verteilung lebender / toter Mikroorganismen auf Schmelzprüfkörpern mittels live-dead-staining bei 100-facher Vergrößerung
Expositionszeiten der Prüfkörper intraoral: 3 min und 48 h



3.2 Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine monozentrische, placebokontrollierte klinisch-experimentelle Fall-/Kontrollstudie im Crossover-Design, an der 18 Probanden teilnahmen. Das Studiendesign wurde von der Ethikkommission unter der Kennnummer E 213/09 genehmigt.

3.2.1 Prüfprodukt

Untersucht wurde eine Test-Zahnpasta mit einer Konzentration von 10^8 inaktivierten (hitzegetrocknet) und nicht gentechnologisch verändertem *Lactobacillus paracasei* je Gramm. Die Herstellerfirma etol GmbH-Werk Oberkirch deklarierte ferner folgende Inhaltsstoffe: Aqua, Sorbitol, Silica, Hydrated Silica, Cocamidopropyl Betaine, Cellulose Gum, Titan Dioxide, Sodium Sulfate, Lactobacillus, Sodium Fluoride, Sodium Saccharin und Allantoin.

3.2.2 Probanden

Einschlusskriterien für die Teilnahme der 18 Probanden zwischen 21 und 44 Jahren waren ein kariesfreies, vollbezahntes Gebiss sowie unauffällige Sulkusblutungs- und Gingivaindizes. Auf eine normale Salivation und gesunde Mundschleimhäute wurde geachtet.

Probanden mit Allgemeinerkrankungen oder einer regelmäßigen Medikamenteneinnahme blieben ausgeschlossen. Auch spezielle Ernährungsgewohnheiten, z.B. übermäßiger Genuss von polyphenolhaltigen Speisen oder laktobazillenhaltigen Produkten (Käse, Joghurt), die mit einer Beeinflussung der Biofilmbildung verbunden sein könnten, führten zum Ausschluss der Teilnahme.

Nach schriftlicher Zustimmung und Information wurden die Probanden einer von zwei Gruppen zugelost.

3.2.3 Biofilmgewinnung

Schienenherstellung

Nach Abformung des Oberkiefers mit dem Alginat Blend-a-print Elastic-Alginat (Procter & Gamble, Schwalbach, Deutschland) folgte die Herstellung der Modelle aus Superhartgips Klasse IV (Die-Stone Peach Klasse IV-Gips, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland). Die Anfertigung der Minioplastschienen erfolgte im Tiefziehverfahren (Erkopress ES 2004, Erkodent GmbH, Pfalzgrafenweiler, Deutschland) mit hartelastischen, transparenten Duran®-Folien 1,0 x 125 mm (Scheu-Dental, Iserlohn, Deutschland).

Aus ästhetischen und phonetischen Gründen umfassten die Schienen lediglich den Bereich zwischen dem 2. Molaren und dem 1. Prämolaren.

Prüfkörper

Als Grundlage für die orale Biofilmgewinnung kam es zur Herstellung von Schmelzprüfkörpern, herausgeschnitten aus den Labialflächen von Rinderfrontzähnen. Entnommen wurden die Zähne aus Rinderköpfen des Schlachthofes Zweibrücken. Die Rinder wurden zum Verzehr weiterverarbeitet, sodass ein Befall der Prüfkörper mit BSE (Bovine spongiforme Enzephalopathie) ausgeschlossen werden konnte. Unmittelbar nach der Extraktion wurden die Rinderzähne in Thymol (0,1%) gelagert.

Mithilfe einer Diamanttrennscheibe (Schleiftrennmaschine WOCO 50p, Conrad GmbH, Clausthal, Deutschland) erfolgte die Trennung von der oralen und der labialen Fläche. Aus den Labialflächen wurden unter Verwendung eines Nassschleifgeräts (Gripo 2V, Metkon Instruments Ltd, Bursa, Türkei) Schmelzprüfkörper mit den Dimensionen 4-5 x 4-5 x 1-1,5 mm hergestellt. Eine standardisierte Prüfkörperoberfläche wurde durch eine Politur mit Silikonkarborundschleifpapier aufsteigender Körnung (bis 4000 Grit) bei einer Umdrehungszahl von 350 min^{-1} erzielt (s. Abbildung Abb. 3-1). Die Kontrolle der Politur erfolgte mit einem Auflichtmikroskop (Zoom-Stereomikroskope SMZ 140, Motic GmbH, Wetzlar, Deutschland) bei 12-facher Vergrößerung.

Zur Desinfektion der Prüfkörper wurden diese für 30 min in 70%iger Ethanollösung gelagert und anschließend in 3%iger Natriumhypochloritlösung im Ultraschallbad (Sonorex RK 100 H, Bandelin, Berlin, Deutschland) gereinigt. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte in 4°C temperiertem, sterilem Wasser.

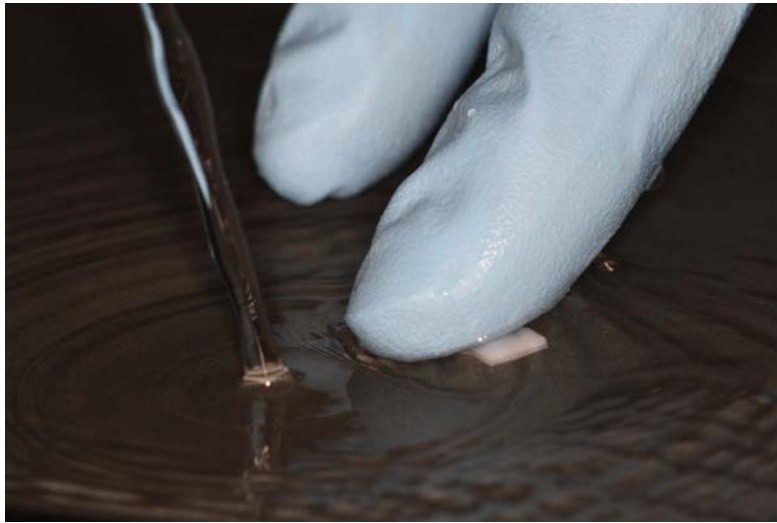


Abb. 3-1 Herstellung eines Prüfkörpers aus bovinem Schmelz

Vorbereitung der Schienen

Die Prüfkörper wurden mithilfe des A-Silikons President light body (Coltène/Whaledent GmbH und Co. KG, Langenau, Deutschland) an den Schienen befestigt (s. Abbildung Abb. 3-2 und Abb. 3-3). Insgesamt wurden sieben Prüfkörper pro Schiene folgendermaßen verteilt: Bukkal wurden jeweils vier Prüfkörper angebracht, die 48 Stunden lang in der Mundhöhle verblieben. Palatinal wurden nur Prüfkörper befestigt, die nach 3 Minuten wieder entnommen werden konnten, da der Tragekomfort an dieser Stelle geringer ist. Unterschiede in der Biofilmbildung zwischen palatinal und bukkal wurden in der vorangegangenen Studie bereits ausgeschlossen. Um einen besseren Vergleich zu gewährleisten, mussten die Prüfkörper, die unterschiedlichen Untersuchungen dienten, immer an derselben Position platziert werden. Der erste mesiale Prüfkörper wurde für die Untersuchung am Fluoreszenzmikroskop und am Rasterelektronenmikroskop verwendet, der zweite diente der DNA-Analyse (Polymerase-Ketten-Reaktion), der dritte wurde mikrobiologisch untersucht und der distale für die Analyse am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM, LSM 710, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland) genutzt. Die Reihenfolge wurde ebenso für die 3-Minuten-Prüfkörper palatinal übernommen. Der distale Prüfkörper palatinal entfiel, da eine Untersuchung am CLSM nach nur drei Minuten Tragedauer nicht sinnvoll ist.



Abb. 3-2 Beispiel einer mit Prüfkörpern bestückten Schiene. Die Fixierung der Prüfkörper erfolgte mit dem Silikon President.

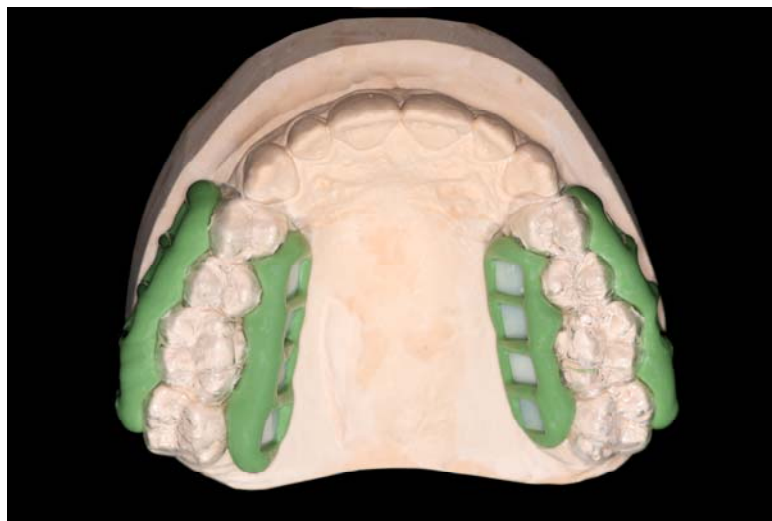


Abb. 3-3 Modell mit zwei bestückten Schienen (Aufsicht)

3.2.4 Versuchsablauf

Nach dem Prinzip des Crossover-Designs erfolgte eine Zulosung der Probanden in zwei Gruppen. Gruppe I (9 Probanden) verwendete im ersten Teil des Versuchs die Placebo-Zahnpasta und im zweiten Durchgang die Laktobazillen enthaltende Zahnpasta. Bei Gruppe II (9 Probanden) wurde in umgekehrter Reihenfolge begonnen. Alle Probanden bekamen für jeden Versuchsabschnitt eine neue Zahnbürste (Sensodyne sensitiv, GlaxoSmithKline Consumer Healthcare GmbH & Co. KG, Brühl, Deutschland).

Nach Erhebung von Plaque- und Gingivaindices und der Durchführung einer professionellen Zahnreinigung startete der Versuch mit einer einwöchigen Auswaschphase. Während dieser Zeit putzten die Probanden ihre Zähne mit einer Handzahnbürste zwei Mal pro Tag unter Anwendung der Placebo-Zahnpasta.

Die anschließende Testphase erstreckte sich über einen Zeitraum von zwei Wochen. Während dieser Zeit verwendete Gruppe I die Placebo-Zahnpasta und Gruppe II bekam die Verum-Zahnpasta für die tägliche Zahnpflege. An den Tagen 8, 15 und 22 der Testphase erfolgte die Erhebung von Plaque- und Gingivaindizes. Zusätzlich wurden von jedem Probanden Speichel- und Plaque-Proben genommen. Gegen Ende der Testphase (Tag 17 und 18) erhielt jeder Proband eine mit Prüfkörpern bestückte Trageschiene, die über einen Zeitraum von 48 h inkorporiert wurde. Beim Zähneputzen verblieb die rechte Schiene die gesamte Zeit im Mund, sodass diese Prüfkörper mit Zahnbürste und Zahnpasta zwei Mal pro Tag gereinigt wurden. Die linke Schiene hingegen wurde erst nach dem Putzen der Oberkieferzähne eingesetzt bzw. im Versuchsverlauf wieder eingestzt. Diese Prüfkörper kamen lediglich mit der Zahnpasta (Zahnpasta-Speichel-Gemisch) in Kontakt, wurden jedoch nicht maschinell gereinigt. Ein Teil der Prüfkörper (drei von jeder Seite) wurde bereits drei Minuten nach dem Zähneputzen entnommen. Die Expositionszeit der übrigen Prüfkörper betrug 48 Stunden.

Nach einer einwöchigen Pause, in der die Probanden ihrer gewohnten Zahnpflege nachkamen, wurde der Versuch für Gruppe I mit der Verum-Zahnpasta, für Gruppe II mit der Placebo-Zahnpasta wiederholt.

3.3 Untersuchungsmethoden

3.3.1 Plaque- und Gingiva-Indices

Mithilfe der Plaque- und Gingiva-Indices wurden Veränderungen der Plaquemenge und Entzündungszeichen der Gingiva im Verlauf des Versuchs dokumentiert. Als Plaque-Index fand der Plaque-Control-Record Verwendung. Nach Anfärben der Zähne mit einer fluoreszierenden Indikatorflüssigkeit (Plaque Test, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein) wurde die Plaque im Bereich von vier Zahnflächen erfasst und prozentual zur Gesamtanzahl der Flächen (max. 128 Messpunkte) errechnet.

Als Gingiva-Index wurde der modifizierte Sulcus-Blutungsindex (mSBI) nach Lange et al. eingesetzt. Nach Ausstreichen des Sulcus im Approximalbereich (im 1. und 3. Quadranten

bukkal sowie im 2. und 4. Quadranten oral) konnte bei Entzündung der Gingiva die Blutung dokumentiert und prozentual zur Gesamtzahl der Approximalkontakte (max. 28 Messpunkte) errechnet werden. Um behandlerabhängige Unterschiede zu vermeiden, erfolgte die Untersuchung immer durch dieselbe Person.

Insgesamt wurden drei Mal während des Versuchs Indizes erhoben: direkt zu Beginn des Versuchs als Referenzwert, nach der Auswaschphase und zuletzt nach Abschluss des Versuchs.



Abb. 3-4 Anfärben der Zähne mit Plaque Test, Ivoclar Vivadent AG

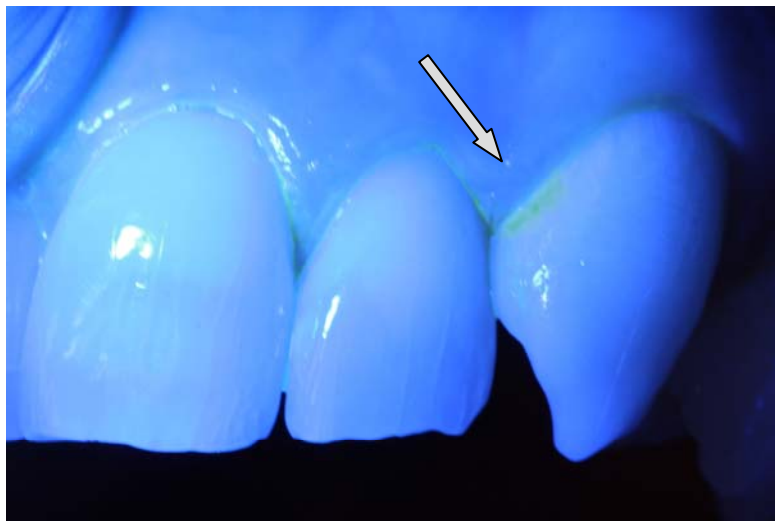


Abb. 3-5 Detektion der Plaque durch Belichtung mit einer Polymerisationslampe (Wellenlänge des Lichts ~ 400-500 nm). Minimal Plaque mesial an Zahn 23 erkennbar.



Abb. 3-6 Durchführung des mSBI (Ausstreichen des Sulcus mithilfe einer WHO-Sonde)

3.3.2 Mikrobiologische Untersuchung

Die mikrobiologische Untersuchung erfolgte anhand von Speichel- und Plaqueproben sowie von Abklatschpräparaten der intraoral exponierten Prüfkörper.

Als Nährboden für die Anzucht der *S. mutans* und Laktobazillen diente, wie unten dargestellt, der Kariesrisikotest (CRT bacteria, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein). Es handelt sich bei diesem Produkt um einen Speicheltest, der im Rahmen der präventionsorientierten Zahnheilkunde zur Abschätzung des individuellen Kariesrisikos eingesetzt wird. Der blaue Mitis-Salivarius-Agar mit Bacitracin dient dem Nachweis von *S. mutans*, mithilfe des durchsichtigen Rogosa-Agars werden Laktobazillen erfasst. Die Proben für die mikrobiologische Analyse wurden immer zur selben Tageszeit (12:00), eine Stunde nach dem Zähneputzen genommen.

Zum Nachweis von *S. mutans* und Laktobazillen sammelten die Probanden eine Minute lang Speichel. Die Salivation wurde dabei durch Kauen auf einem Paraffinpellet stimuliert. Beide Agars wurden vollständig, ohne sie zu zerkratzen, mit dem Speichel benetzt und für 48 Stunden bei 37°C im Brutschrank (Inkubator – Serie BD-115, Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) inkubiert. Eine NaHCO₂-Tablette, die während der Inkubation auf den Boden des CRT-Röhrchens gelegt wurde, förderte durch CO₂-Abgabe das Wachstum der Bakterien. Nach Auszählen der Kolonien auf den einzelnen CRT wurde der Mittelwert aller Placebo- und Verum-Proben gebildet und miteinander verglichen.

Zur Bestimmung von *S. mutans* und Laktobazillen in der Plaque wurden jedem Probanden mithilfe eines Microbrushs (Microbrush X – extended reach applicator, Microbrush International, Grafton, Vereinigte Staaten von Amerika) Plaque aus den Zahnzwischenräumen entnommen, auf dem CRT Agar ausgestrichen und für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Für den Nachweis der *S. mutans* erfolgte die Entnahme der Plaque aus dem Zahnzwischenraum 15/16, zur Kultivierung der Laktobazillen diente die Plaque aus dem Zahnzwischenraum 25/26. Zur Auswertung wurden die Abklatschpräparate der Verum- und Placeboprüfkörper anhand eines Scorings miteinander verglichen.

Durch Abklatschpräparate der Prüfkörper auf den CRT konnten *S. mutans* und Laktobazillen im Biofilm nachgewiesen werden. Die initiale Adhäsion von Bakterien wurde durch Prüfkörper untersucht, die drei Minuten in der Mundhöhle exponiert waren. Nach 48 Stunden Exposition konnte ein etablierter Biofilm auf *S. mutans* und Laktobazillen analysiert werden. Die Auswertung der Abklatschpräparate erfolgte nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C anhand eines Scorings.



Abb. 3-7 proximale Plaqueentnahme mithilfe eines Microbrushs



Abb. 3-8 Verwendeter Kariesrisikotest (CRT bacteria, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein) mit Pipette und NaHCO₂-Tablette

3.3.3 Fluoreszenzmikroskopie und konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie und der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie konnte durch live-dead-staining der Anteil an lebenden und toten Bakterien im Biofilm dargestellt werden. Mit dieser Methode wurde untersucht, ob sich die hitzeinaktivierten toten Laktobazillen aus der Zahnpasta im Biofilm anreichern.

Untersucht wurden auch hier die initiale Adhärenz der Bakterien nach drei Minuten Expositionszeit sowie der etablierte Biofilm nach 48 Stunden. Nach Entnahme der Prüfkörper wurden diese durch Absprühen mit destilliertem Wasser von Speichelresten und anderen Auflagerungen befreit. Im Anschluss wurden die Bakterien mit den zwei Fluoreszenzfarbstoffen SYTO 9 und Propidiumiodid (LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit, Molecular Probes, Eugene, Oregon, Vereinigte Staaten von Amerika) benetzt. Nach Mischung der zwei Farbstoffe (je 1,5µl) mit 500µl NaCl wurde die Lösung auf die Prüfkörper aufgetragen und nach 15 Minuten Einwirkzeit mit NaCl wieder ausgewaschen.

Aus allen vier Quadranten eines Prüfkörpers wurden mithilfe des Fluoreszenzmikroskops (Leica DMRB, Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Germany) Bilder bei 100-facher Vergrößerung aufgenommen.

Für die Auswertung wurde das Verhältnis des Rot-Anteils der mit Verum-Zahnpasta behandelten Biofilme zum Rot-Anteil der Placebo-Biofilme ermittelt.

Prüfkörper, die von einem dichten Biofilm bewachsen waren, wurden zusätzlich mithilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM, LSM 710, Carl Zeiss Microscopy GmbH,

Göttingen, Deutschland) untersucht. Bei diesem Verfahren können, ähnlich einer Tomographie, Schnittbilder durch die Probe angefertigt werden. Die Einlagerung von Laktobazillen (als rote Stäbchen) in den Biofilm kann so sichtbar gemacht werden.

3.3.4 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

Zur morphologischen Untersuchung der Prüfkörper kam die Rasterelektronenmikroskopie zum Einsatz.

Vorbereitung der Proben

Nach Entnahme der Prüfkörper wurden diese für zwei Stunden in einer 2,5%igen Glutaraldehyd-Lösung (in 0,01 M Cacodylat-Puffer, pH 7) fixiert. Es folgten fünf Waschschriffe (je 10 Minuten) mit Cacodylat-Puffer. Nach der Entwässerung der Biofilme über eine aufsteigende Ethanolreihe (3x 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 3x 100%, je 10 Minuten) wurden die Proben für 30 Minuten mit Hexamethyldisilazan infiltriert und luftgetrocknet.

Abb. 3-9 Tabelle: Alkoholreihe

Glutaraldehyd 2,5%	Cacodylat- Puffer	Alkoholreihe						HMDS
		50 %	60 %	70 %	80 %	90 %	100 %	
2 h	5x 10 min	3x 10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	3x 10 min	30 min

Nach vollständiger Entwässerung der Proben wurden diese mithilfe einer leitfähigen Klebefolie (Leit-Tabs, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) auf REM-taugliche Probenhalter aus Aluminium (Specimen Stubs, Agar Scientific Ltd, Essex, England) fixiert und mit einer dünnen Palladiumschicht besputtert (Sputter Coater SC 7640, Polaron Equipment Ltd-Quorum technologies, Newhaven, England).

Untersuchung der Biofilme

Die Oberfläche der Prüfkörper wurde systematisch mit einem Rasterelektronenmikroskop (Quanta 200 HV, Fei Company, Eindhoven, Niederlande) bei Vergrößerungen bis zu 20.000-fach untersucht und morphologische Unterschiede zwischen den verschiedenen Bio-

filmen wurden registriert. Von jedem Quadranten der Prüfkörper wurden Bilder aufgenommen, die im folgenden Schritt der Auswertung der Biofilmmorphologie dienten.

Bei der Auswertung wurde die Menge stäbchenförmiger Bakterien im Biofilm von mit Verum-Zahnpasta behandelten Prüfkörpern zur Stäbchenanzahl bei mit Placebo-Zahnpasta behandelten Prüfkörpern ins Verhältnis gesetzt.

Für die Untersuchung am REM dienten lediglich die Prüfkörper, die einen erhöhten Rot-Anteil bei der Fluoreszenzmikroskopie aufwiesen.

3.3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Als molekularbiologische Untersuchung zur Quantifizierung von *S. mutans* und der Gesamtbakterien-DNA in den Biofilmproben diente die quantitative real-time Polymerasekettenreaktion (qPCR) nach DNA-Extraktion.

Die Extraktion der bakteriellen DNA erfolgte mit einem geeigneten Kit (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Prüfkörper mit 48 Stunden alten Biofilmen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf) gegeben und 180µl ATL-Puffer sowie 20µl Proteinase K hinzugefügt. Nach einminütigem Vortexen wurde der Reaktionsansatz für eine Stunde bei 56°C inkubiert und nach kurzer Zentrifugation und Zugabe von 200µl AL-Puffer für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Die Probe wurde nach erneuter Zentrifugation mit 200ml Ethanol versetzt und der Reaktionsansatz auf eine QIAamp Spinsäule gegeben und danach für eine Minute bei 6000g noch einmal zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen, die Spinsäule in ein neues Reaktionsgefäß platziert und 500µl der Lösung AW1 hinzugegeben. Dann folgte eine einminütige Zentrifugation mit 6000g. Dieses Zentrifugat wurde nochmals verworfen und die Säule in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 500µl Puffer AW2 wurde die Probe drei Minuten bei maximaler Drehzahl zentrifugiert. Nach Verwerfen des Zentrifugats wurde die Säule in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und 100µl des Elutionspuffers AE hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde anschließend für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweiminütigem Zentrifugieren bei 6000g wurden nochmals 100 µl AE in die Säule gegeben, noch einmal wurde für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend für zwei Minuten zentrifugiert. Die DNA-Lösung wurde bis zu ihrer weiteren Verarbeitung bei -80 °C verwahrt.

Für die Bestimmung der Gesamtzahl der Kopien bakterieller 16S rRNA-Gene wurden jeweils 5 µl, für die Bestimmung der Kopienzahl der 16S *S. mutans* rRNA-Gene jeweils 10 µl der DNA-Lösung eingesetzt.

Der Reaktionsansatz enthielt für die Bestimmung der *S. mutans* 16 rDNA 25 µl Sensi Mix, 3 µl MgCl₂ (50 mM), 2 µl SybrGreen (alle Quantace SensiMix (dT), Watford, GB), 9 µl ddH₂O und 0,5 µl der beiden Primer (40 pmol/µl) Smfo: 5'-GGTCAGGAAA GTCTGGAGTAAAAGGCTA-3 und Smre: 5'-GCGGTAGCTCCGGCACTAAGCC-3. Das PCR-Produkt besaß eine zu erwartende Länge von 282 Basenpaaren (Rupf et al., 1999b). Der Reaktionsansatz für die Bestimmung der gesamten bakteriellen 16S rDNA enthielt 25 µl Sensi Mix, 3 µl MgCl₂ (50 mM), 2 µl SybrGreen (alle Quantace SensiMix (dT), Watford, GB), 14 µl ddH₂O und 0,5 µl der beiden Primer (40 pmol/µl) Bacfo: 5'-ACTACG TGCCAGCAGCC-3 und Bacre: 5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCC-3. Das erwartete PCR-Produkt besaß Längen zwischen 296 - 300 Basenpaaren (Rupf et al., 1999a).

Alle PCRs wurden 3fach in einem real time PCR-Gerät Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science, Mortlake, Australien) durchgeführt. Schmelzprüfkörper ohne Biofilm dienten als Negativkontrollen. Die Ermittlung der Kopienanzahl der bakteriellen bzw. der *S. mutans* 16S rDNA-Gene erfolgte durch Mitführung von Verdünnungsreihen entsprechender DNA mit den zu amplifizierenden Gen-Abschnitten in jedem PCR-Lauf. Es wurden pro Reaktionsansatz in den Verdünnungsreihen für *S. mutans* 10¹ – 10⁴ DNA-Kopien und für Bakterien 10³ – 10⁶ DNA-Kopien in Zehnerverdünnungsschritten mitgeführt. Unter Nutzung der Quantifizierungsoption der Rotor Gene Software wurde die Anzahl der DNA-Kopien für *S. mutans* errechnet, sowie die Gesamtbakterienanzahl, bezogen auf den Prüfkörper.

3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung des Programmpakets SPSS (PASW Statistics18, IBM, USA). Für die Bewertung von Veränderungen von Scores für Plaque und gingivale Entzündung sowie für die CRT-Teststreifen wurde der Wilcoxon-Test genutzt. Gemessene Werte und ausgezählte Kolonien wurden mit dem t-Test für gepaarte Stichproben nach Prüfung auf Normalverteilung bewertet. Bei einem p-Wert von < 0,05 wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen als statistisch signifikant bewertet.

3.5 Zusätzliche Versuche

3.5.1 Wirkung unterschiedlicher Laktobazillenkonzentrationen

In einem nachträglichen Versuch an drei Probanden wurde die Wirkung unterschiedlicher Laktobazillenkonzentrationen auf die Reduktion von *S. mutans* im Speichel untersucht.

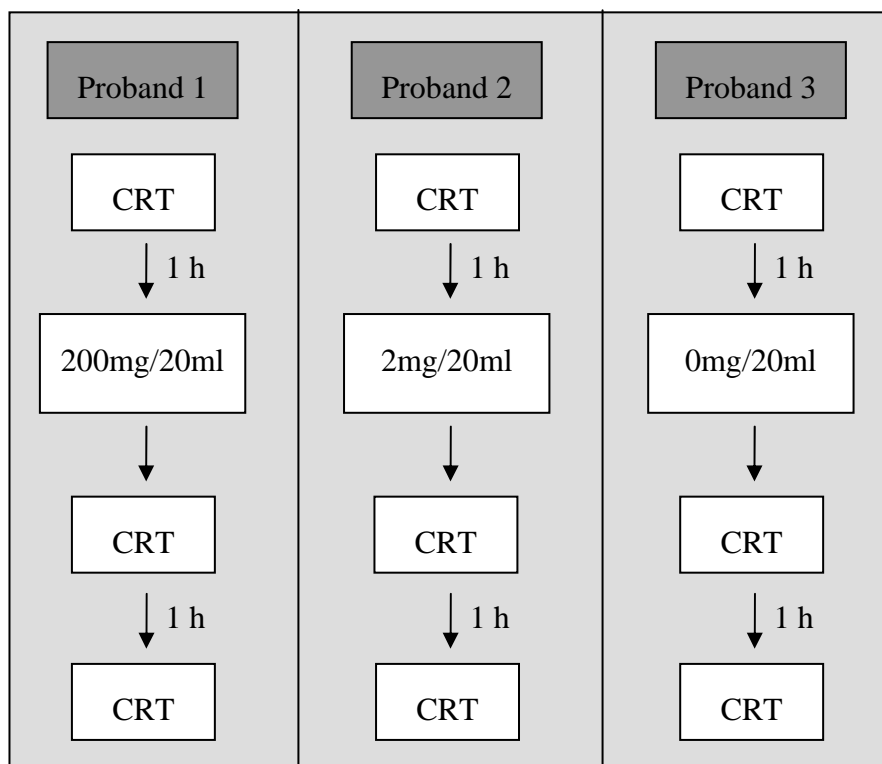
Darreichungsform der Laktobazillen erfolgte als Pulver ($2 \cdot 10^8$ Laktobazillen/mg), welches in NaCl gelöst wurde.

Eine Stunde vor Versuchsbeginn führte jeder Proband einen Speicheltest (CRT) nach Herstellerangaben durch. Dieser diente als Referenzwert für den weiteren Versuchsablauf.

Nach einer Stunde spülten die Probanden 30 Sekunden mit 20 ml Spüllösung und direkt im Anschluss 10 Sekunden mit Wasser. Proband 1 erhielt eine Spüllösung in der 200 mg des Laktobazillen-Pulvers in 20 ml NaCl gelöst waren, Proband 2 spülte mit einer Menge von 2 mg/20 ml, Proband 3 bekam nur NaCl.

Es folgten zwei weitere Speicheltests, und zwar der erste direkt nach der Spülung, der zweite eine Stunde später.

Abb: 3-10 Tabelle: Übersicht Speicheltest



Die Spüllösung wurde aufgefangen und auf Aggregationen zwischen roten (toten) Stäbchen und grünen (lebenden) Kokken im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Proben wurden hierfür zunächst bei 2000 Umdrehungen für drei Minuten zentrifugiert (CR3i Jouan Multifunction Centrifuge, Thermo Electron Corporation, Erlangen, Deutschland) und mit NaCl versetzt, bevor der Fluoreszenzfarbstoff hinzugefügt wurde.

3.5.2 Repartition der Laktobazillen in der Verum-Zahnpasta

Zur Untersuchung der Laktobazillenverteilung und zur visuellen Darstellung der Bakterien in der Verum-Zahnpasta wurde diese unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Es erfolgten ein dünner Ausstrich der Zahnpasta auf einem Objektträger und eine vorsichtige Benetzung mit dem Fluoreszenzfarbstoff.

3.5.3 Untersuchung des Zahnpasta-Expektorats

Von zwei Probanden wurde nach dem Zähneputzen das Zahnpasta-Speichel-Gemisch aufgefangen und unter dem Fluoreszenzmikroskop auf mögliche Aggregationen zwischen roten (toten) Stäbchen und grünen (lebenden) Kokken untersucht.

Nach Zentrifugation des Zahnpasta-Speichel-Gemischs wurde dieses mit NaCl versetzt und mit dem Fluoreszenzfarbstoff gemischt, bevor es unter dem Mikroskop untersucht werden konnte.

Bei diesem Versuch kamen sowohl die Verum- als auch die Placebo-Zahnpasta zur Untersuchung.

4 Ergebnisse

4.1 Auswertung der Plaque- und Gingivaindices

Plaque- und Gingiva-Indizes wurden jeweils drei Mal, zu Beginn des Versuchs, eine Woche nach der professionellen Zahnreinigung sowie nach zwei Wochen Testphase erhoben.

Insgesamt lagen am Ende beider Versuchsreihen (Placebo-Zahnpasta und Verum-Zahnpasta) für jeden Probanden sechs Werte für den Plaque-control-record und sechs Werte für den modifizierten Sulkus-Blutungsindex vor. Die Mittelwerte aller Indizes sind in den unten dargestellten Diagrammen aufgeführt. Das Diagramm zeigt, dass es sowohl bei Verwendung der Placebo-Zahnpasta als auch bei Gebrauch der Verum-Zahnpasta zu einem leichten Anstieg der Plaquemenge kam. Bei Anwendung der Placebo-Zahnpasta stieg der Plaque-control-record von 11,3% auf 16,3% an, bei Verwendung der Verum-Zahnpasta von 8,9% auf 12,75%. Beim modifizierten Sulkus-Blutungsindex kam es dagegen zunächst zu einem leichten Rückgang der Werte, nach Durchführung der Testphase stiegen die Werte für beide Zahnpasten jedoch wieder an.

Abb. 4-1 Grafik Mittelwerte des PCR vor und nach Durchführung der Testphase

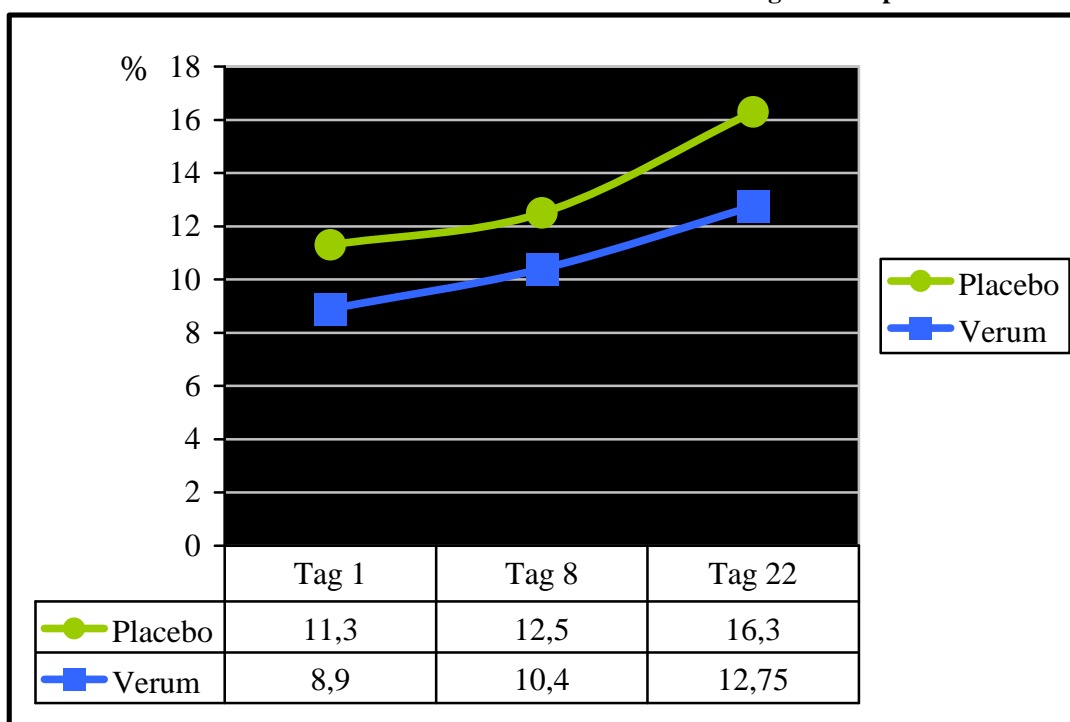
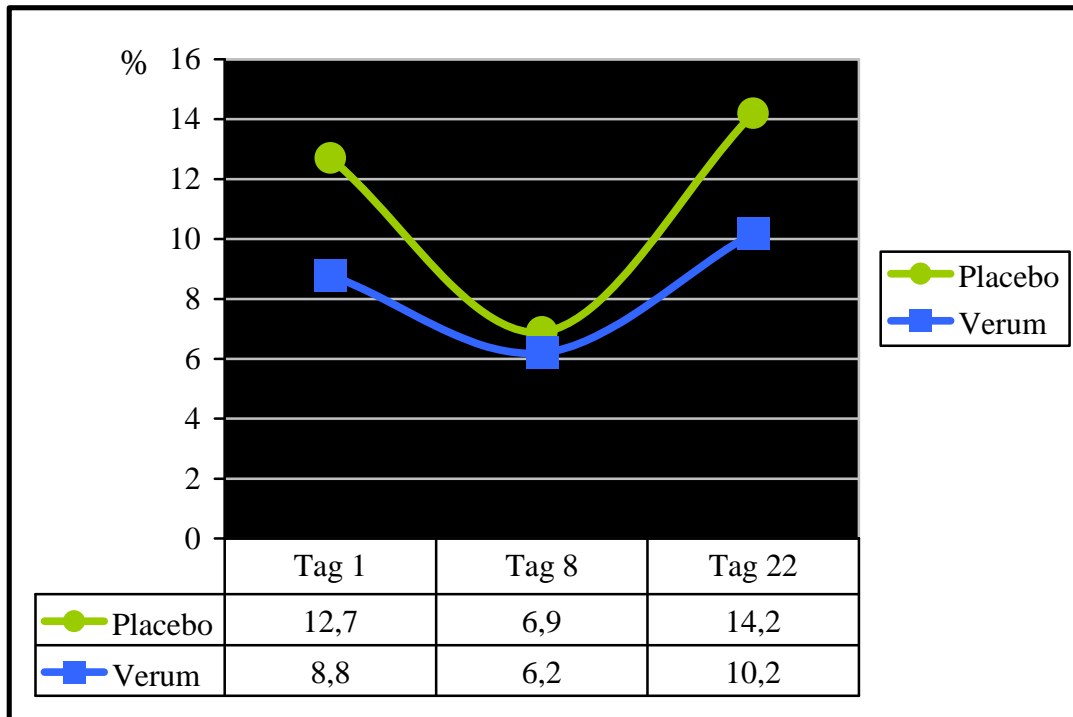


Abb. 4-2 Grafik Mittelwerte des mSBI vor und nach Durchführung der Testphase



4.2 Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung

Mit der mikrobiologischen Untersuchung wurden verschiedene Ziele verfolgt. Die Abklatschpräparate der Prüfkörper und Ausstriche der approximalen Plaque auf den CRTs dienten dem Nachweis von *S. mutans* und lebenden Laktobazillen im Biofilm. Durch die Speichelproben hingegen sollte die Menge an *S. mutans* und Laktobazillen im Speichel bestimmt werden.

4.2.1 Abklatschpräparate der Prüfkörper

Zum Nachweis von *S. mutans* im Biofilm wurden intraoral exponierte Prüfkörper nach drei Minuten und 48 Stunden Tragezeit auf ein Mitis-Salivarius-Agar mit Bacitracin aufgedrückt und für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Ein Rogosa-Agar diente der Anzucht von Laktobazillen. Die Auswertung erfolgte durch Ermittlung eines Scorings von 0 bis 2. Ein Score von 0 wurde vergeben, wenn Placebo- und Verum- Prüfkörper die gleiche Anzahl an Kolonien aufwiesen. Konnten mehr Kolonien auf der Seite der Verum-Prüfkörper entdeckt werden, entsprach dies einem Score von 1. Wenn sich umgekehrt mehr Kolonien auf den Placebo-Prüfkörpern zeigten, wurde ein Score von 2 vergeben. Die im Folgenden dargestellten Diagramme zeigen die Verteilung der ermittelten Scores für *S. mutans* und die Laktobazillen. Auf

den drei Minuten exponierten Prüfkörpern waren in den meisten Fällen keine *S. mutans*-Kolonien erkennbar, sodass hier der Score von 0 dominierte (15 von 18 Prüfkörper). Nach 48 Stunden konnten auf den ungeputzten Verum-Prüfkörpern vermehrt Kolonien entdeckt werden, sodass hier der Score von 1 leicht überwog (10 von 18 Prüfkörper).

Abb. 4-3 Grafik Scoring der geputzten und ungeputzten Prüfkörper (3 min) (Anzahl der Kolonien)

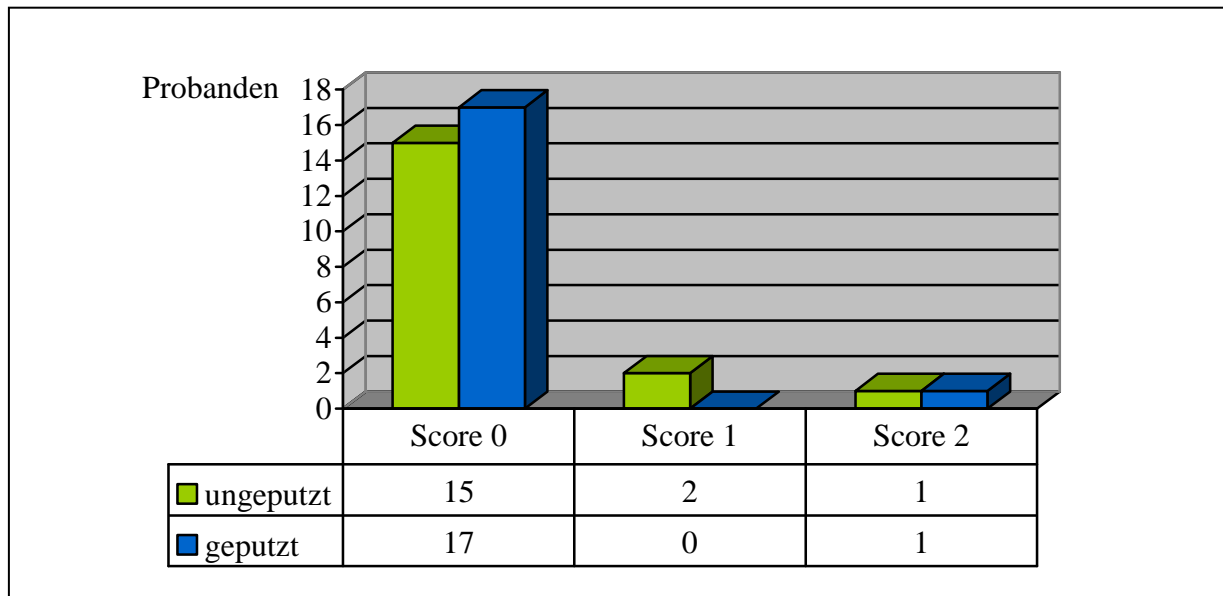
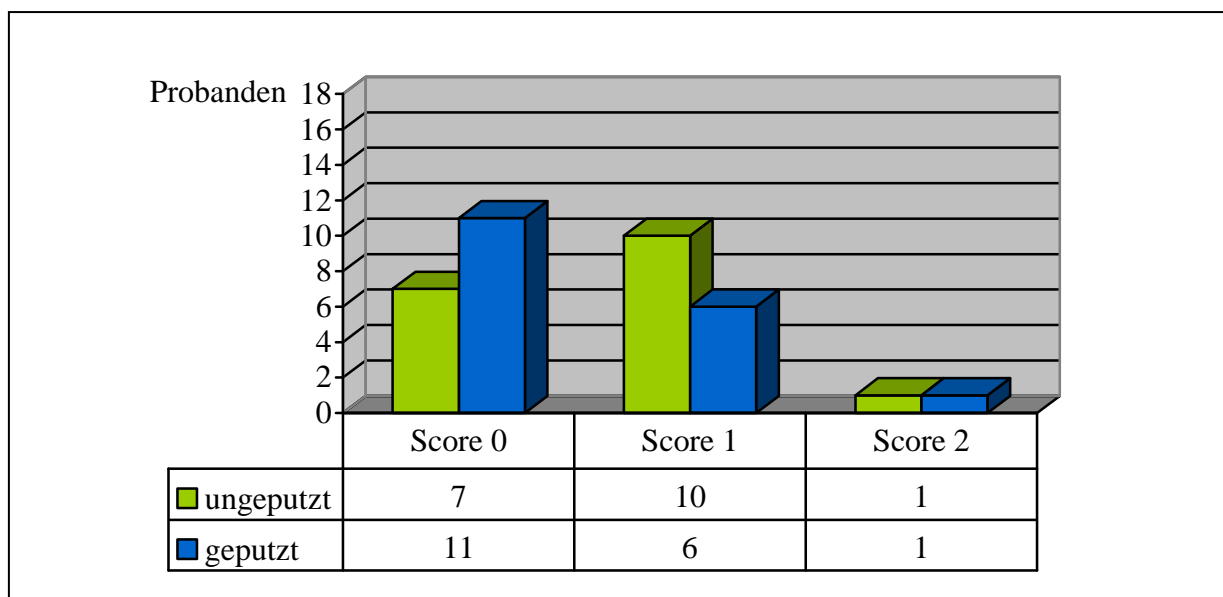


Abb. 4-4 Grafik Scoring der geputzten und ungeputzten (48 h) (Kolonienanzahl der *S. mutans*)



Die folgenden zwei Abbildungen zeigen die Verteilung der Scores für die Laktobazillen-Kolonien. Nach drei Minuten waren keine Unterschiede in der Anzahl der Kolonien zu verzeichnen (s. Abb. **Abb. 4-5**). Auch nach 48 Stunden waren überwiegend gleiche Kolonienmengen auf den Verum- und Placebo-Prüfkörpern zu finden (bei 11 von 18 Probanden). Selten befanden sich mehr Kolonien auf den Placebo Prüfkörpern (5 (ungeputzt) bzw. 4 (geputzt) von 18 Probanden). Die ermittelten Scores zeigten im Vergleich, sowohl für *S. mutans* als auch für Laktobazillen, keine statistische Signifikanz.

Abb. 4-5 Grafik Scoring der ungeputzten Prüfkörper (3 min) (Kolonienanzahl der Laktobazillen)

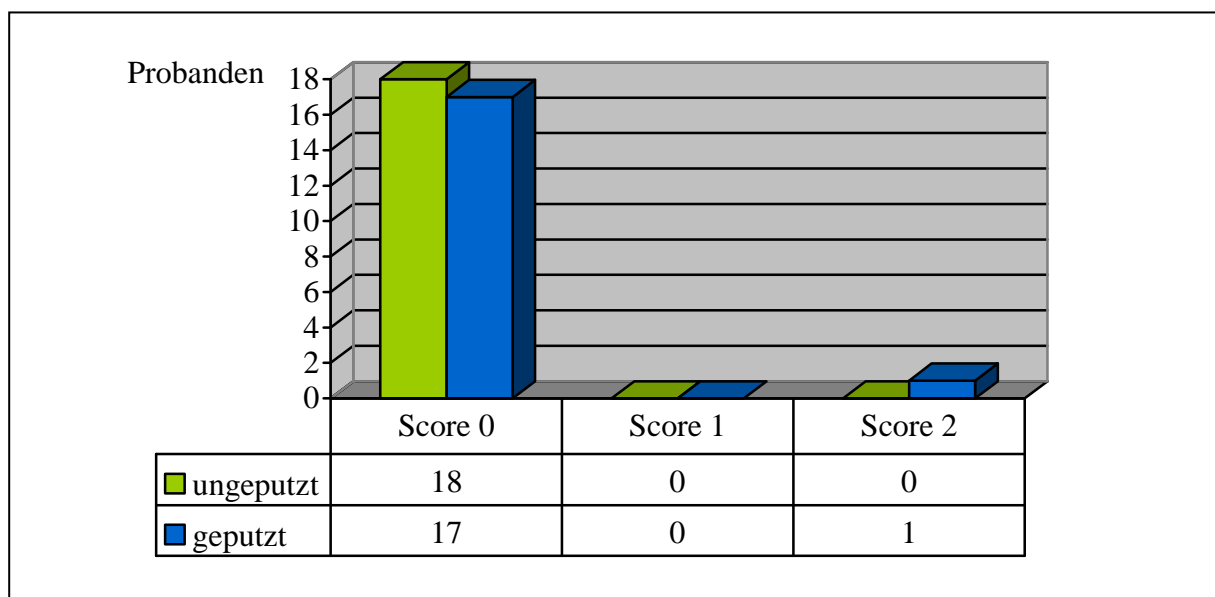
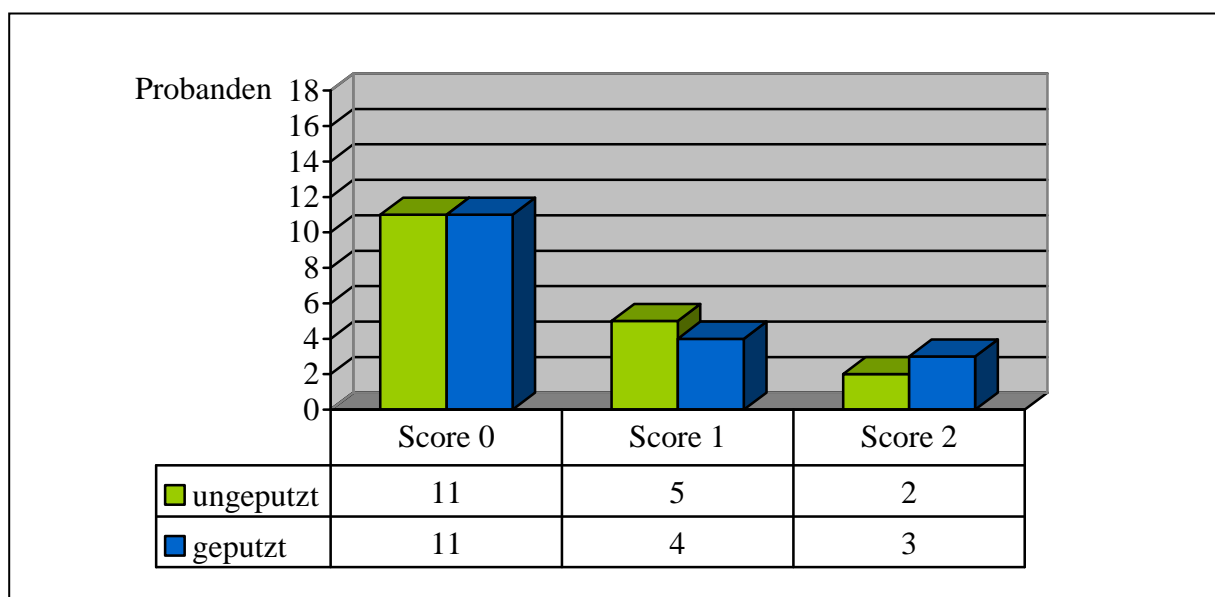


Abb. 4-6 Grafik Scoring der ungeputzten Prüfkörper (48 h) (Kolonienanzahl der Laktobazillen)



Die Abbildungen Abb. 4-7 und Abb. 4-8 stellen Abklatschpräparate von vier 48 Stunden-Prüfkörpern auf einem MSB-Agar dar. Bei den zwei folgenden Abbildungen Abb. 4-9 und Abb. 4-10 handelt es sich um Abklatschpräparate auf einem Rogosa-Agar. Die folgenden Bilder zeigen auf der linken Seite Abklatschpräparate ungeputzter und auf der rechten Seite geputzter Prüfkörper. Zur besseren Darstellung wurden die Konturen der Prüfkörper in Blau nachgezogen. Jeder Prüfkörper wurde drei Mal (im Bild von oben nach unten) auf den Agar aufgesetzt und kurz angedrückt, sodass eine Verdünnungsreihe entstand. Das gewählte Beispiel zeigt sowohl für die *S. mutans*-Bakterien als auch für die Laktobazillen einen Score von 1, erkennbar daran, dass auf den Abklatschpräparaten der Verum-Prüfkörper mehr Kolonien wuchsen als auf denen der Placebo-Prüfkörper.

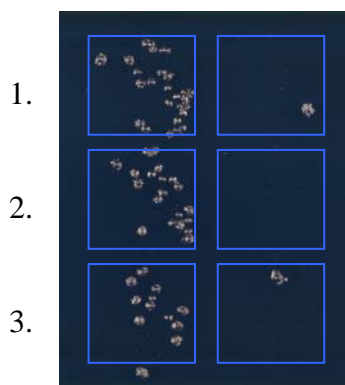


Abb. 4-7 Abklatschpräparate (MSB-Agar) von 48 h Verum-Prüfkörpern (links ungeputzt, rechts geputzt)

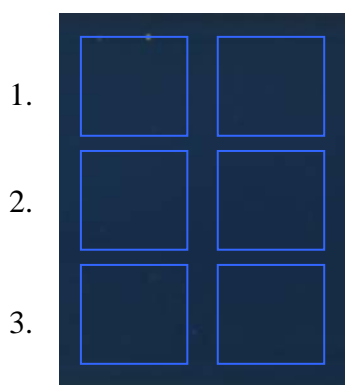


Abb. 4-8 Abklatschpräparate (MSB-Agar) von 48 h Placebo-Prüfkörpern (links ungeputzt, rechts geputzt)

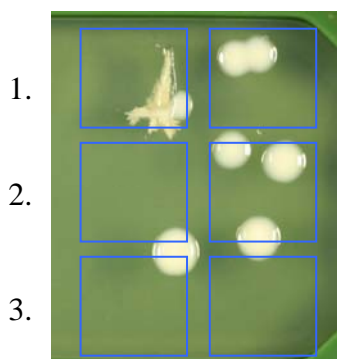


Abb. 4-9 Abklatschpräparate (Rogosa-Agar) von 48 h Verum-Prüfkörpern (links ungeputzt, rechts geputzt)

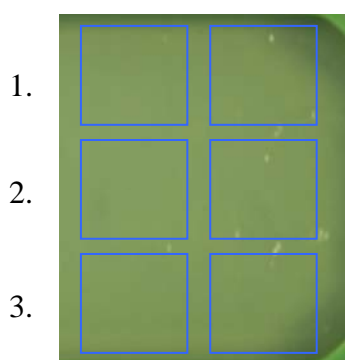


Abb. 4-10 Abklatschpräparate (Rogosa-Agar) von 48 h Placebo-Prüfkörpern (links ungeputzt, rechts geputzt)

4.2.2 Untersuchung der approximalen Plaque

Um zusätzlich Informationen über das Vorhandensein von *S. mutans* im approximalen Biofilm zu erhalten, wurden bei jedem Probanden in regelmäßigen Abständen Plaqueproben aus den Zahnzwischenräumen entnommen. Dabei wurde jedes Mal derselbe Zwischenraum gewählt. Nach dreimaligem Ausstreichen der Plaque auf die Agarplatte (Verdünnungsreihe) erfolgte die Inkubation für 48 Stunden bei 37°C und eine Auswertung mittels Scoring. Dabei wurden die Proben vor und zwei Wochen nach Anwendung der jeweiligen Zahnpasta verglichen. Veränderte sich die Kolonienmenge nach zwei Wochen nicht, wurde der Score [=] vergeben. Ein Anstieg der Kolonienanzahl wurde mit dem Score [+] bewertet, ein Abfall mit dem Score [-]. Anhand dieser Auswertung zeigte sich, dass ein Rückgang der Bakterienmenge (*S. mutans* und Laktobazillen) für beide Zahnpasten nur selten zu vermerken war. Ein Unterschied zwischen beiden Zahnpasten konnte lediglich im Anstieg der Kolonien festgestellt werden. Während es bei der Placebo-Zahnpasta in neun Fällen (für *S. mutans* und Laktobazillen) zu einem Anstieg kam, wurde dieses Phänomen lediglich bei einem (*S. mutans*)

bzw. zwei (Laktobazillen) Probanden nach Anwendung der Verum-Zahnpasta beobachtet. Diese Ergebnisse zeigten jedoch keine statistische Signifikanz.

Abb. 4-11 Scoring der approximalen Plaque-Proben zum Zeitpunkt 0 und nach 2 Wochen (*S. mutans*)

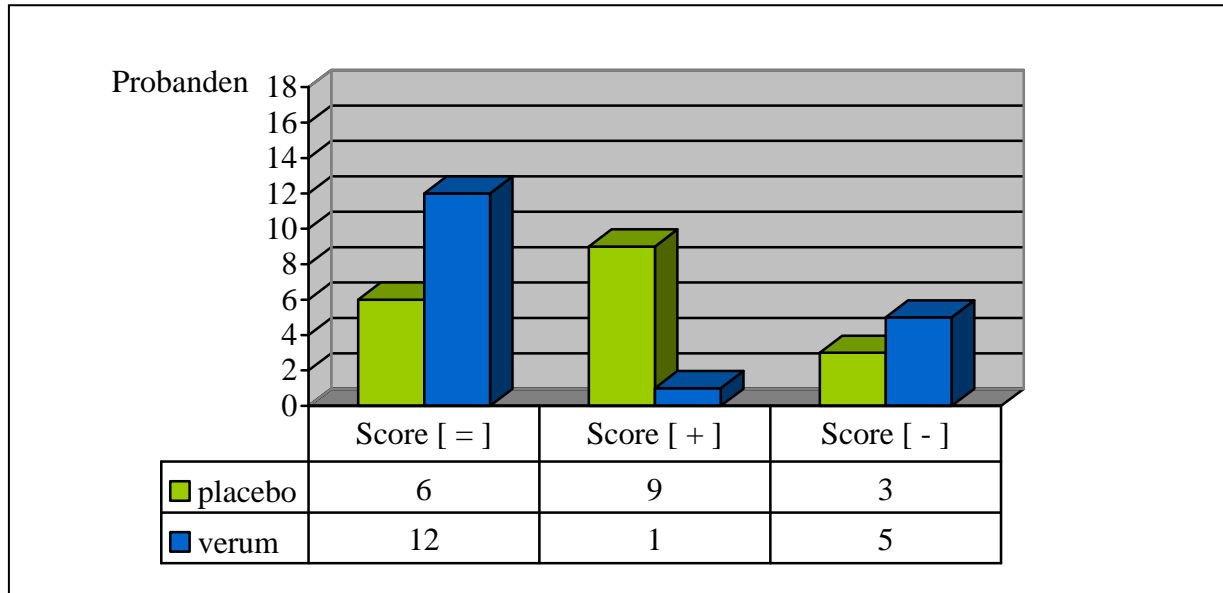
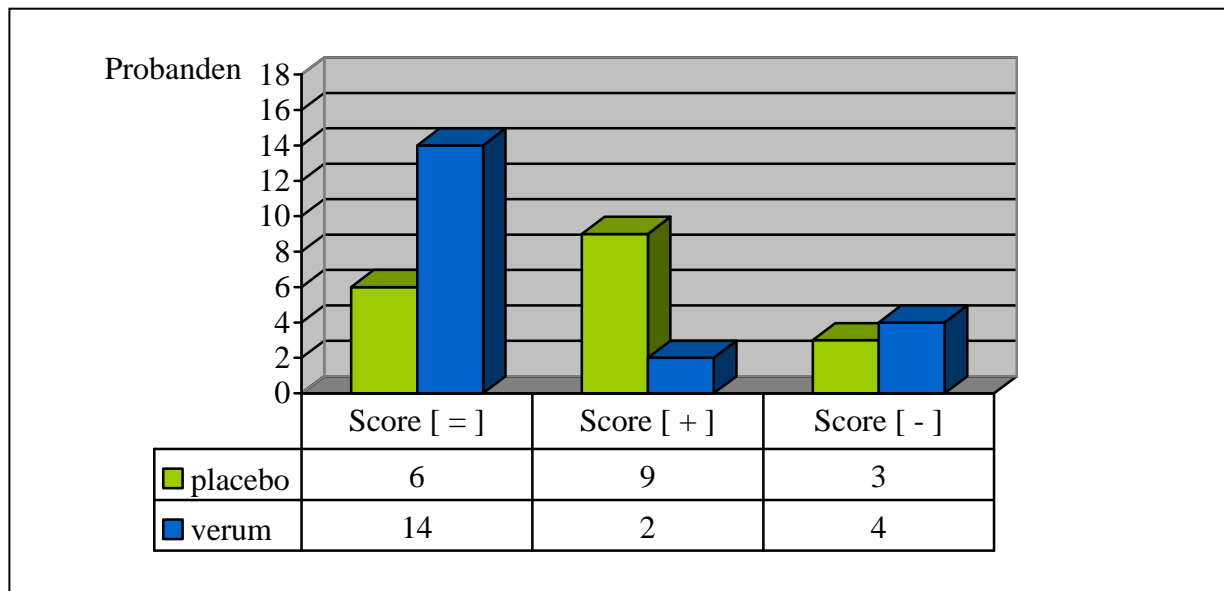


Abb. 4-12 Scoring der approximalen Plaque-Proben zum Zeitpunkt 0 und nach 2 Wochen (Laktobazillen)



In den folgenden Abbildungen Abb. 4-13, Abb. 4-14, Abb. 4-15 und Abb. 4-16 werden Beispiele der mikrobiologischen Untersuchungen der approximalen Plaque (*S. mustans*) eines Probanden gezeigt. Auf der linken Seite ist der Ausstrich der Plaque vor (Abb. 4-13) und zwei Wochen nach (Abb. 4-15) der Anwendung der Verum-Zahnpasta dargestellt. Die rechte Seite zeigt Bilder der Ausstriche vor (Abb. 4-14) und nach (Abb. 4-16) Anwendung der Placebo-Zahnpasta. Erkennbar ist eine unveränderte Menge an Kolonien auf der linken Seite (Score [=] für Verum-Zahnpasta). Auf der rechten Seite hingegen zeigt sich eine Erhöhung der Kolonienzahl, was als Score [+] bewertet wird.



Abb. 4-13 Ausstrich der approx. Plaque zum Zeitpunkt 0, vor Anwendung der Verum-Zahnpasta



Abb. 4-14 Ausstrich der approx. Plaque zum Zeitpunkt 0, vor Anwendung der Placebo-Zahnpasta

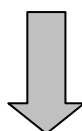


Abb. 4-15 Ausstrich der approx. Plaque 2 Wochen nach Anwendung der Verum-Zahnpasta



Abb. 4-16 Ausstrich der approx. Plaque 2 Wochen nach Anwendung der Placebo-Zahnpasta

Die folgenden Abbildungen Abb. 4-17, Abb. 4-18, Abb. 4-19 und Abb. 4-20 zeigen mikrobiologische Untersuchungen der approximalen Plaque (Laktobazillen). Dargestellt sind eine unveränderte Menge an Kolonien auf der linken Seite (Score [=] für Verum-Zahnpasta) sowie eine Erhöhung der Kolonienzahl auf der rechten Seite (Score [+]).



Abb. 4-17 Ausstrich der approx. Plaque zum Zeitpunkt 0, vor Anwendung der Verum-Zahnpasta



Abb. 4-18 Ausstrich der approx. Plaque zum Zeitpunkt 0, vor Anwendung der Placebo-Zahnpasta

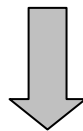


Abb. 4-19 Ausstrich der approx. Plaque 2 Wochen nach Anwendung der Verum-Zahnpasta



Abb. 4-20 Ausstrich der approx. Plaque 2 Wochen nach Anwendung der Placebo-Zahnpasta

4.2.3 Untersuchung des Speichels

Zur Bestimmung der Menge an *S. mutans* bzw. Laktobazillen im Speichel wurden man jeweils drei Kariesrisikotests durchgeführt, und zwar der erste eine Woche nach erfolgter professioneller Zahnreinigung, der zweite acht Tage später und der dritte am Ende der Versuchsreihe. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Kariesrisikotests fotografiert und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte dabei durch Auszählen der Kolonien sowie durch Anwendung eines Scorings. Aus den jeweiligen Ergebnissen der zwei Versuchsreihen (Placebo- und Verum-Zahnpasta) wurden Mittelwerte gebildet, die miteinander verglichen werden konnten. Bei der Auswertung blieb der zweite Kariesrisikotest unberücksichtigt.

Die folgenden Diagramme 4-21 bis 4-24 zeigen die auf den Agarplatten ausgezählte Menge für *S. mutans* und Laktobazillen, hochgerechnet auf 1 ml Speichel. Es ist nach beiden Versuchsreihen (Placebo- und Verum-Zahnpasta) ein geringfügiger Rückgang der *S. mutans*-Kolonien nach zweiwöchiger Anwendung der jeweiligen Zahnpasta zu vermerken. Die Anzahl der *S. mutans* pro Milliliter Speichel veränderte sich von lg 4,98 (vor Beginn des Versuchs) auf lg 4,93 (Ende des Versuchs) nach Anwendung der Placebo-Zahnpasta und von lg 5,17 auf lg 5,13 nach Anwendung der Verum-Zahnpasta. Die Menge der Laktobazillen pro Milliliter Speichel verringerte sich geringfügig von lg 3,93 auf lg 3,92 nach 14-tägiger Anwendung der Placebo-Zahnpasta. Nach Gebrauch der Verum-Zahnpasta konnte ein leichter Anstieg von lg 3,97 Laktobazillen pro Milliliter auf lg 4,11 festgestellt werden. Bei den zuvor genannten Werten handelt es sich um die Mittelwerte aller Probanden.

Abb. 4-21 Kolonienanzahl der *S. mutans* (pro ml Speichel) vor Beginn der 14-tägigen Testphase

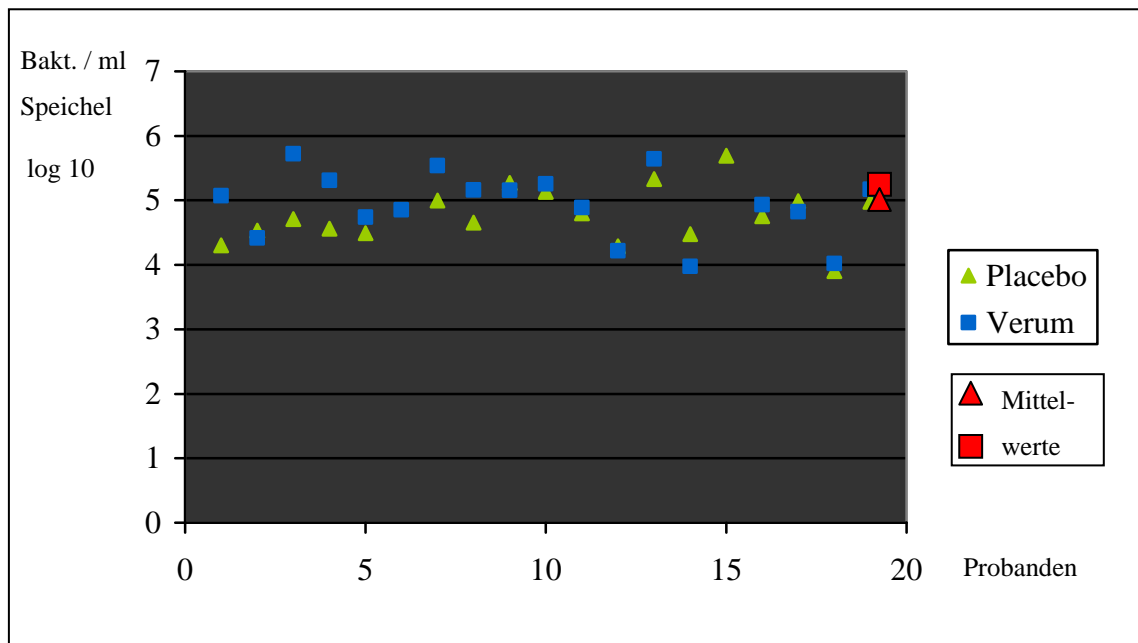


Abb. 4-22 Kolonienanzahl der *S. mutans* (pro ml Speichel) nach der 14-tägigen Testphase

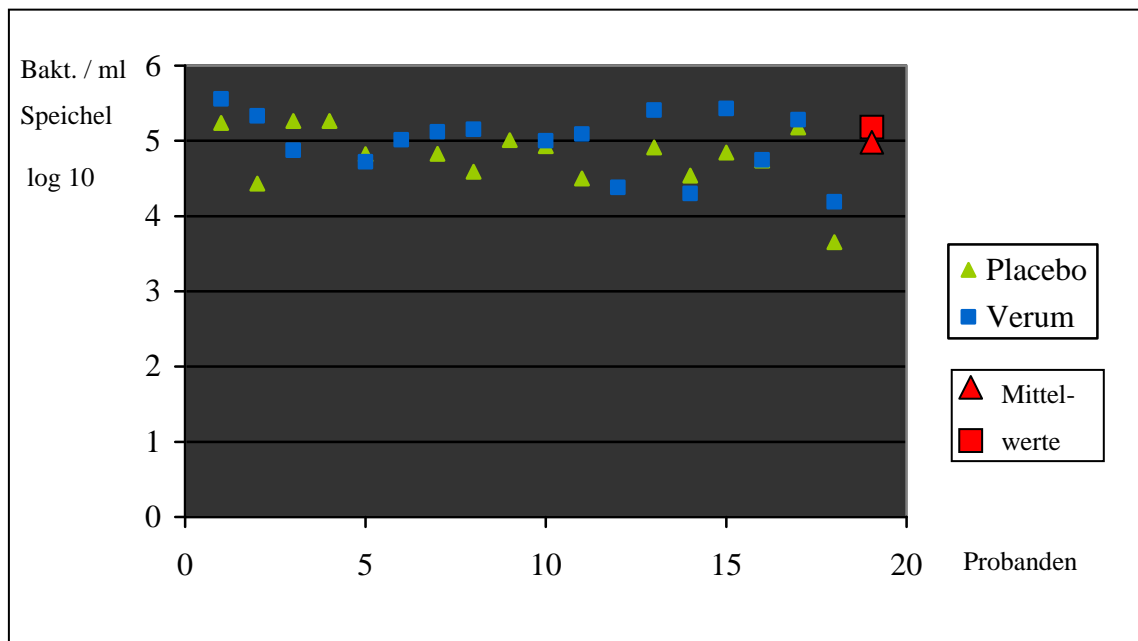


Abb. 4-23 Kolonienanzahl der Laktobazillen (pro ml Speichel) zu Beginn der 14-tägigen Testphase

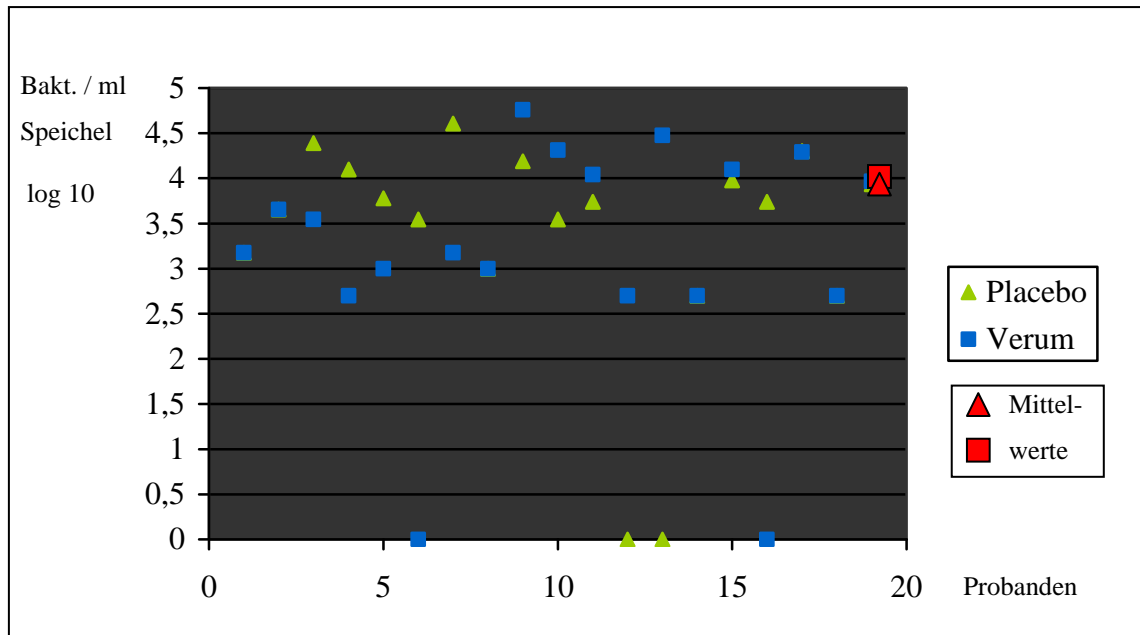
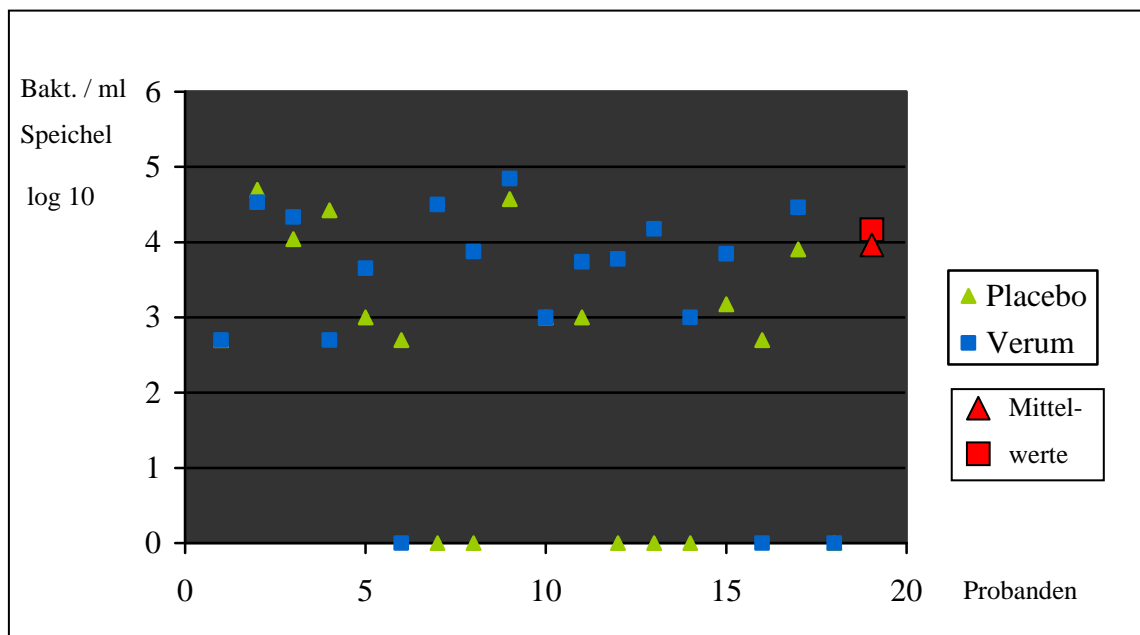


Abb. 4-24 Kolonienanzahl der Laktobazillen (pro ml Speichel) nach der 14-tägigen Testphase



Zusätzlich zur Anzahl der Kolonien wurde ein Scoring der einzelnen Kariesrisikotests durchgeführt. Die Ergebnisse des Scorings sind in den zwei folgenden Diagrammen aufgeführt.

Abb. 4-25 Median der Scoringergebnisse: *S. mutans* zu Beginn und nach Beendigung der 14-tägigen Testphase

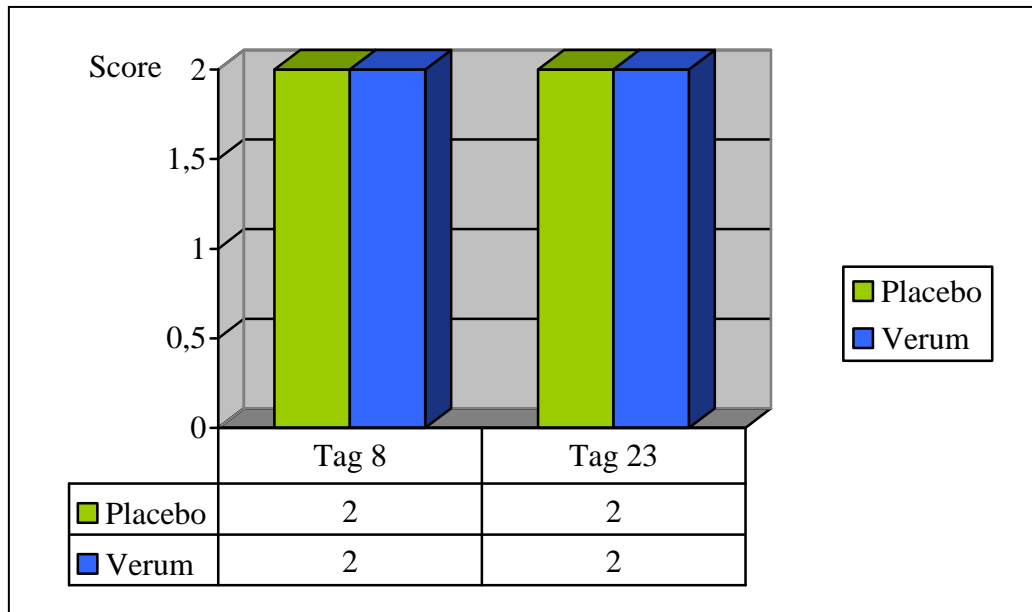
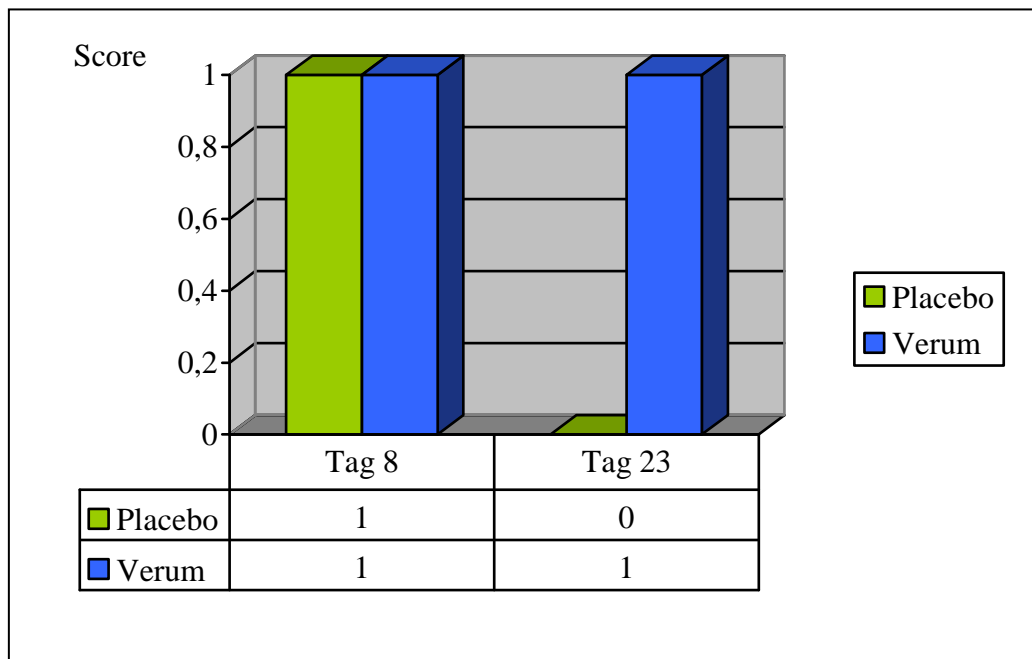


Abb. 4-26 Median der Scoringergebnisse: Laktobazillen zu Beginn und nach Beendigung der 14-tägigen Testphase



Die oben aufgeführten Ergebnisse für das Scoring zeigen, dass die Anwendung der Placebo- und Verum-Zahnpasten zu keinem Unterschied in der *S. mutans*-Menge führten. Für beide Zahnpasten lag jeweils vor und nach ihrer 14-tägigen Anwendung ein Score von 2 vor. Anhand der Scoringergebnisse war vor und nach der Anwendung der Verum-Zahnpasta kein Unterschied in der Laktobazillenmenge (Speichel) zu verzeichnen. Lediglich nach Verwen-

dung der Placebo-Zahnpasta sank die Laktobazillenmenge im Speichel von Score 1 auf Score 0. Statistisch konnte weder für die Scoringergebnisse noch für die Kolonienauszählung eine Signifikanz nachgewiesen werden.



Abb. 4-27 Beispiel eines CRTs mit einer sehr niedrigen Kolonienanzahl. Score: 0



Abb. 4-28 Beispiel eines CRTs mit einer niedrigen Kolonienanzahl. Score: 1



Abb. 4-29 Beispiel eines CRTs mit einer hohen Kolonienanzahl. Score: 2



Abb. 4-30 Beispiel eines CRTs mit einer sehr hohen Kolonienanzahl. Score: 3

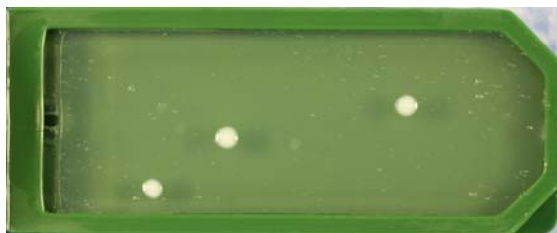


Abb. 4-31 Beispiel eines CRTs mit einer sehr niedrigen Kolonienanzahl. Score: 0

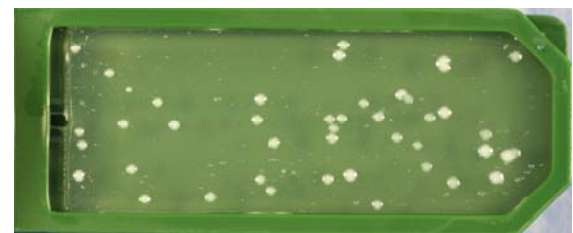


Abb. 4-32 Beispiel eines CRTs mit einer niedrigen Kolonienanzahl. Score: 1

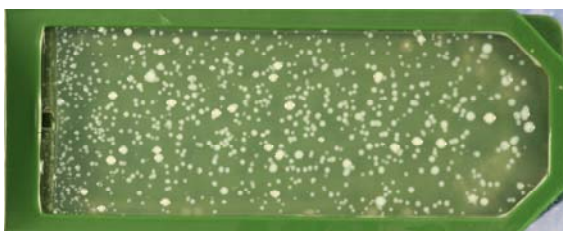


Abb. 4-33 Beispiel eines CRTs mit einer hohen Kolonienanzahl. Score: 2



Abb. 4-34 Beispiel eines CRTs mit einer sehr hohen Kolonienanzahl. Score: 3

4.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Biofilme

Mit der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung sollten zwei Ziele verfolgt werden:

1. Die Bestimmung der Biofilmmenge, die sich nach drei Minuten bzw. nach 48 Stunden auf den Prüfkörpern gebildet hatte.
2. Die Bestimmung des Verhältnisses von toten und lebenden Mikroorganismen im initialen (3 min) und etablierten (48 h) Biofilm.

Von allen Prüfkörpern wurden vier Bilder (jeweils eins aus jedem Quadranten) angefertigt.

Bei der Auswertung wurden jeweils die durch Laktobazillen-Zahnpasta und Placebo-Zahnpasta beeinflussten Prüfkörper einer jeweiligen Seite (rechts = geputzt und links = ungeputzt) miteinander verglichen. Für jeden Probanden ergaben sich demnach 8 Scores:

1. Vergleich der Biofilmmenge nach 3 min unter dem Einfluss von Laktobazillen- und Placebo-Zahnpasta (Prüfkörper jeweils immer mitgeputzt)
2. Vergleich der Biofilmmenge nach 3 min unter dem Einfluss von Laktobazillen- und Placebo-Zahnpasta (Prüfkörper ungeputzt)
3. Vergleich der Biofilmmenge nach 48 h unter dem Einfluss von Laktobazillen- und Placebo-Zahnpasta (Prüfkörper jeweils immer mitgeputzt)
4. Vergleich der Biofilmmenge nach 48 h unter dem Einfluss von Laktobazillen- und Placebo-Zahnpasta (Prüfkörper ungeputzt)
5. Vergleich des Rot-Grün-Verhältnisses nach 3 min unter dem Einfluss von Laktobazillen- und Placebo-Zahnpasta (Prüfkörper jeweils immer mitgeputzt)
6. Vergleich des Rot-Grün-Verhältnisses nach 3 min unter dem Einfluss von Laktobazillen- und Placebo-Zahnpasta (Prüfkörper ungeputzt)
7. Vergleich des Rot-Grün-Verhältnisses nach 48 h unter dem Einfluss von Laktobazillen- und Placebo-Zahnpasta (Prüfkörper jeweils immer mitgeputzt)
8. Vergleich des Rot-Grün-Verhältnisses nach 48 h unter dem Einfluss von Laktobazillen- und Placebo-Zahnpasta (Prüfkörper ungeputzt)

Bei gleicher Biofilmmenge bzw. gleichem Rot-Grün-Verhältnis der Prüfkörper wurde ein Score von 0 vergeben. Überwog die Biofilmmenge bzw. der Rot-Anteil auf den mit Laktobazillen behandelten Prüfkörpern, ergab sich ein Score von 1, war umgekehrt die Biofilmmenge bzw. der Rot-Anteil geringer, lautete der Score 2.

4.3.1 Bewertung des Rot-Grün-Verhältnisses

Nach 3 min Tragezeit war, wie in Abbildung Abb. 4-35 dargestellt, für die ungeputzten Prüfkörper an 10 Proben ein Score von 0, an sieben Proben ein Score von 1 und lediglich an einer Probe ein Score von 2 zu verzeichnen. Für die geputzten Prüfkörper wurden 13 mit einem Score von 0 und fünf mit einem Score von 1 bewertet. Keine einzige Probe wies einen Score von 2 auf.

Nach 48 h lautete die Bewertung der ungeputzten Prüfkörper folgendermaßen: acht Mal Score 0, zehn Mal Score 1, kein einziges Mal Score 2. Bei den geputzten Proben ergab sich 13 Mal ein Score von 0, zwei Mal ein Score von 1 und drei Mal ein Score von 2. In Abbildung 4-35 ist das Scoring graphisch dargestellt. Nach Auswertung der Ergebnisse war weder für die drei Minuten, noch für die 48 Stunden exponierten Prüfkörper eine statistische Signifikanz nachzuweisen.

Abb. 4-35 Scoring der 3 min Prüfkörper (Rot-Grün-Verhältnis)

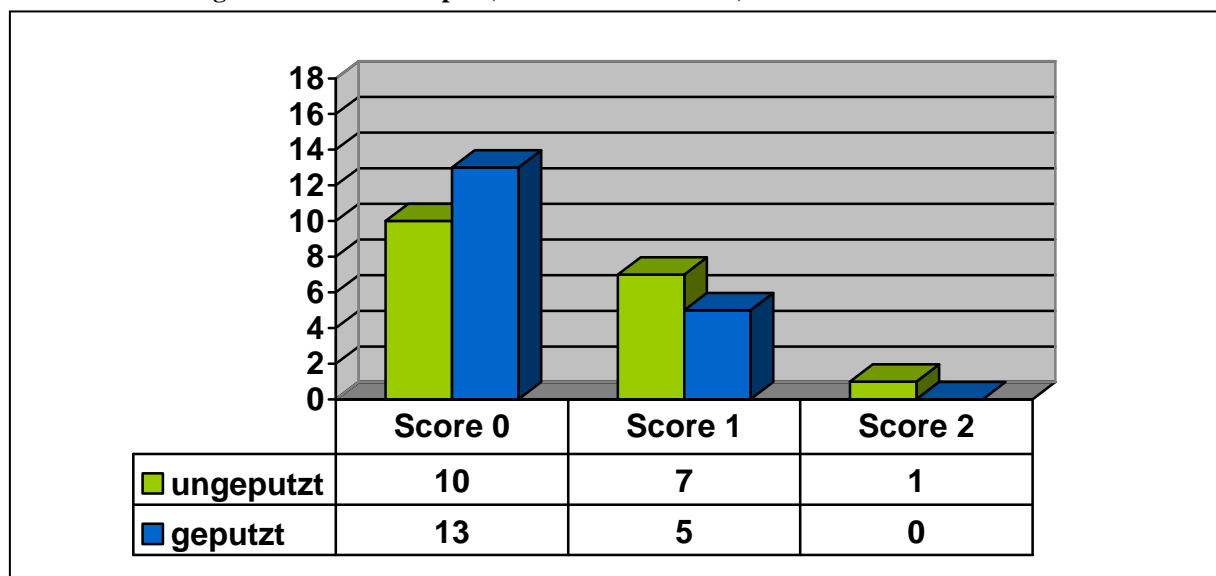
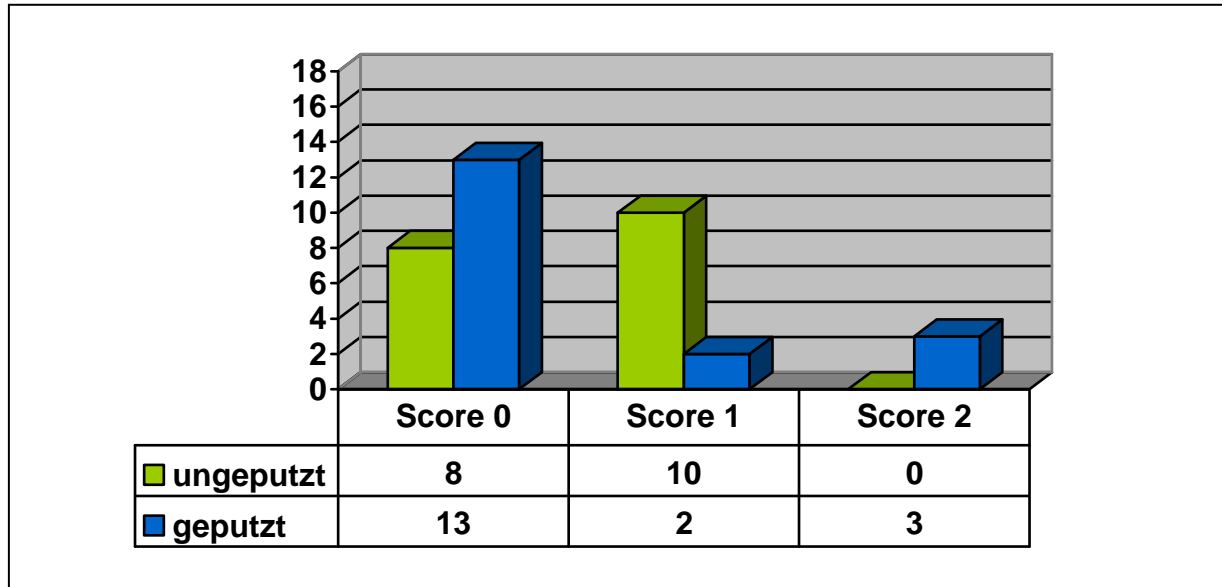


Abb. 4-36 Scoring der 48 h Prüfkörper (Rot-Grün-Verhältnis)

4.3.2 Bewertung der Biofilmmenge

Nach drei Minuten Tragezeit war auf den ungeputzten Prüfkörpern sowohl bei den mit Placebo als auch bei den mit Laktobazillen behandelten Proben neun Mal die gleiche Biofilmmenge (Score=0) zu verzeichnen. Acht weitere Proben wiesen einen Score von 1 auf und nur eine Probe zeigte einen Score von 2. Für die geputzten Prüfkörper lautete das Scoring wie folgt: zwölf Mal ein Score von 0, 6 Mal ein Score von 1 und kein einziges Mal ein Score von 2.

Nach 48 Stunden konnte für die ungeputzten Prüfkörper fünf Mal ein Score von 0, zehn Mal ein Score von 1 und drei Mal ein Score von 2 festgestellt werden. Bei den geputzten Prüfkörpern lag sechs Mal ein Score von 0, fünf Mal ein Score von 1 und sieben Mal ein Score von 2 vor. Auch hier lag keine statistische Signifikanz vor.

Die Abbildungen 4-37 und 4-38 stellen die Scores im Detail dar.

Abb. 4-37 Scoring der 3 min Prüfkörper (Biofilmmenge)

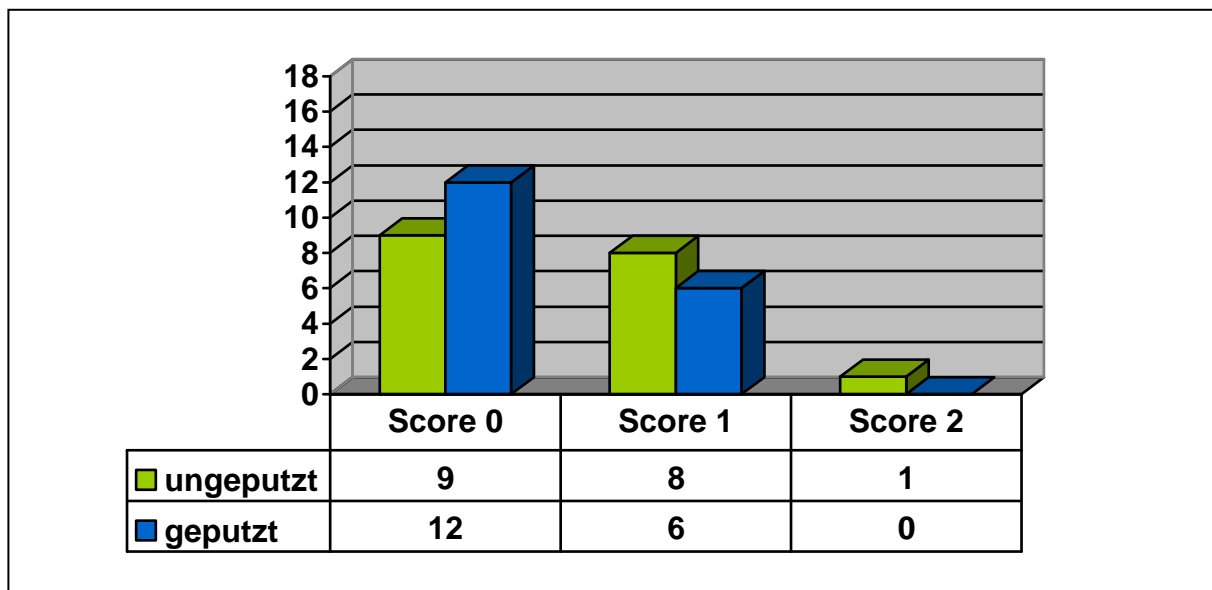
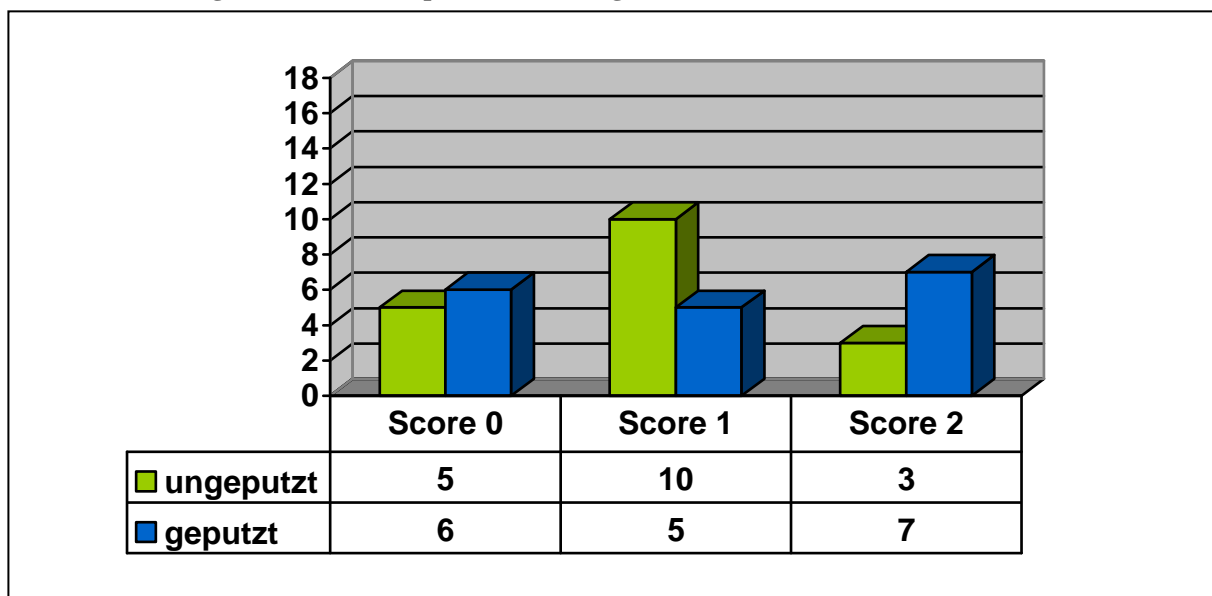


Abb. 4-38 Scoring der 48 h Prüfkörper (Biofilmmenge)



Die nachfolgenden fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen veranschaulichen die oben aufgeführten Ergebnisse. Die Abbildungen Abb. 4-39 und Abb. 4-40 zeigen Aufnahmen eines drei Minuten in der Mundhöhle exponierten Prüfkörpers. Beide sind, wie in den meisten Fällen vorgefunden, frei von Bakterien und wurden mit einem Score von 0 bewertet. Erkennbar sind lediglich angeschliffene Schmelzprismen, die durch die Eigenfluoreszenz des Schmelzes grün erscheinen. Darunter sind zwei Prüfkörper abgebildet, auf denen sich vereinzelt Bakterienkolonien angesiedelt haben. Auf dem rechten Prüfkörper (Laktobazillen-Zahnpasta) befinden sich größere Kolonien von toten (roten) Bakterien als auf dem linken Prüfkörper (Place-

bo-Zahnpasta), sodass hier sowohl für die Biofilmmenge als auch für das Rot-Grün-Verhältnis ein Score von 2 vorliegt.

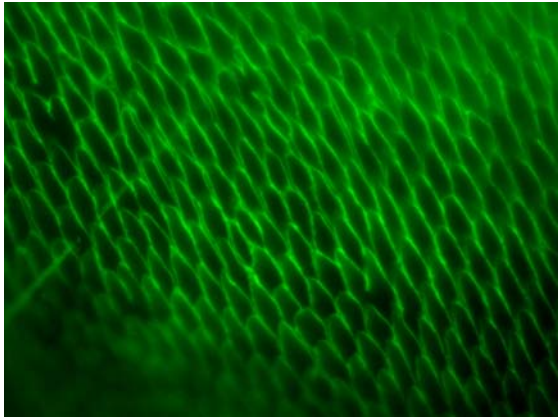


Abb. 4-39 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines 3 min Prüfkörpers ohne Bakterien (Placebo-Zahnpasta)

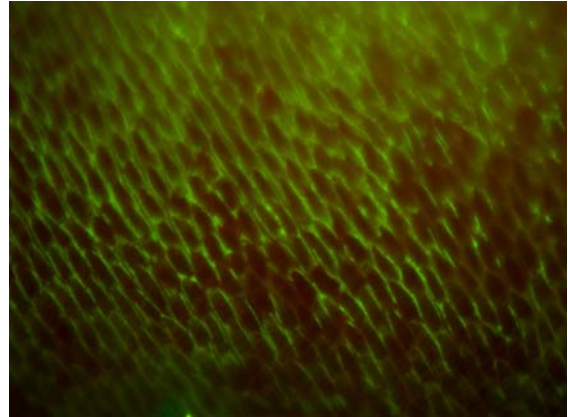


Abb. 4-40 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines 3 min Prüfkörpers ohne Bakterien (Laktobazillen-Zahnpasta)

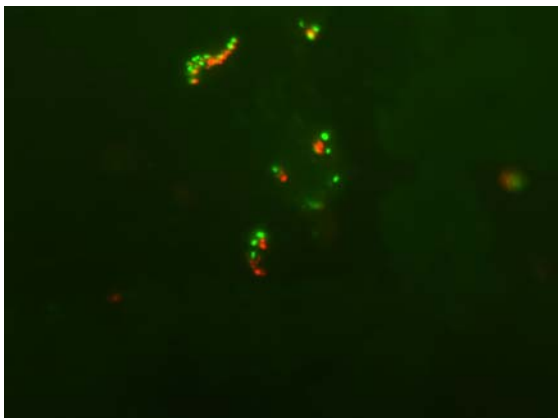


Abb. 4-41 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines 3 min Prüfkörpers mit vereinzelt toten und lebenden Bakterien (Placebo-Zahnpasta)

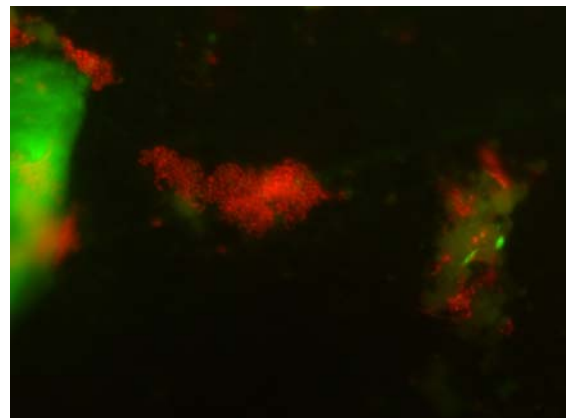


Abb. 4-42 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines 3 min Prüfkörpers mit einer größeren Kolonie toter (roter) Bakterien (Laktobazillen-Zahnpasta)

In seltenen Fällen waren auf den 3-Minuten-Prüfkörpern an Zahnpastarückstände gebundene rote Stäbchenaggregationen zu erkennen. Diese traten aber meist ohne Verbindung zu anderen, grün angefärbten Bakterien auf. Die Abbildungen Abb. 4-43 und Abb. 4-44 zeigen Beispiele für das beschriebene Phänomen.

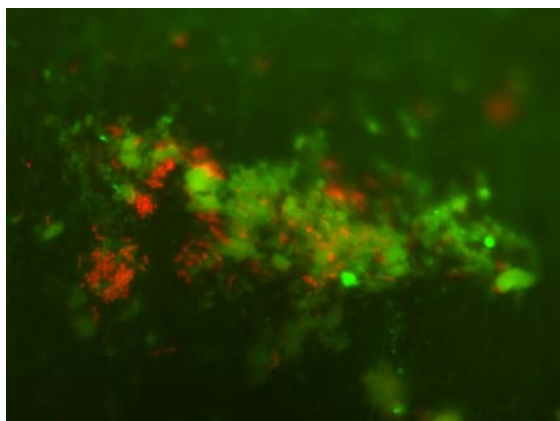


Abb. 4-43 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines 3 min Prüfkörpers mit roten Stäbchen-Aggregationen an Zahnpastarückständen (grüne Masse) gebunden

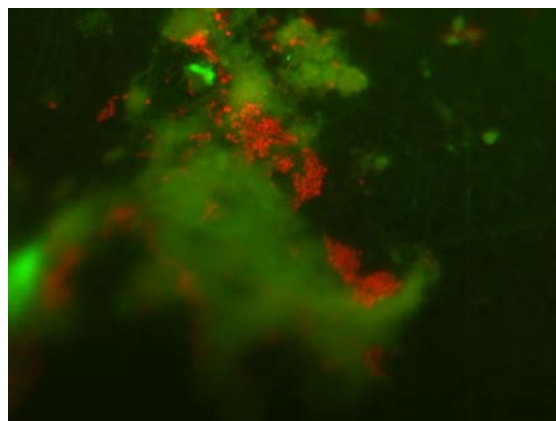


Abb. 4-44 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines 3 min Prüfkörpers mit roten Stäbchen-Aggregationen an Zahnpastarückständen (grüne Masse) gebunden

Nachfolgende Abbildungen zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen 48 Stunden alter Biofilme. In den Abbildungen Abb. 4-45 und Abb. 4-46 sind sowohl die Biofilmmenge als auch der Anteil toter Bakterien innerhalb des Biofilms miteinander vergleichbar, sodass hier ein Score von 0 vorliegt. Die Abbildungen 4-47 und 4-48 zeigen deutliche Unterschiede. Aufgrund der größeren Biofilmmenge und des höheren Anteils an toten (roten) Bakterien auf dem mit Laktobazillen-Zahnpasta behandelten Prüfkörper wurde ein Score von 1 vergeben.

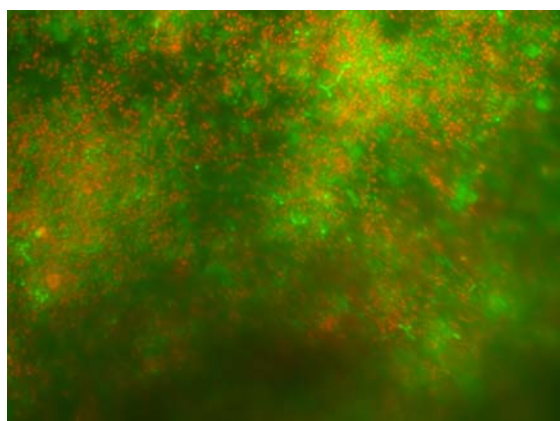


Abb. 4-45 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines 48 h Prüfkörpers auf dem sich ein dichter Biofilm aus überwiegend lebenden Bakterien bildete (Placebo-Zahnpasta)

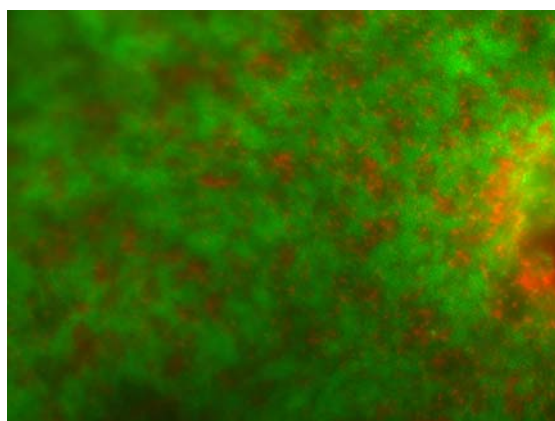


Abb. 4-46 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines 48 h Prüfkörpers auf dem sich ein dichter Biofilm aus überwiegend lebenden Bakterien bildete (Laktobazillen-Zahnpasta)

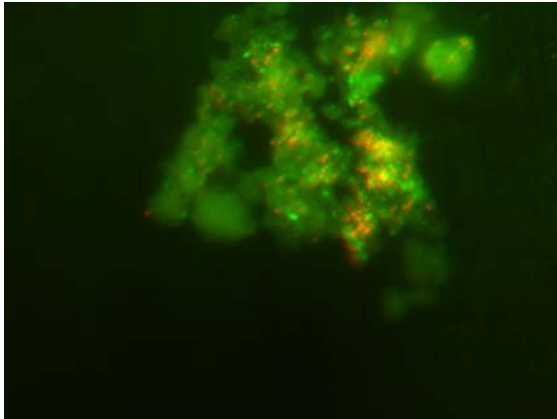


Abb. 4-47 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines 48 h Prüfkörpers mit einem überwiegenden Anteil an lebenden Mikroorganismen (Placebo-Zahnpasta)

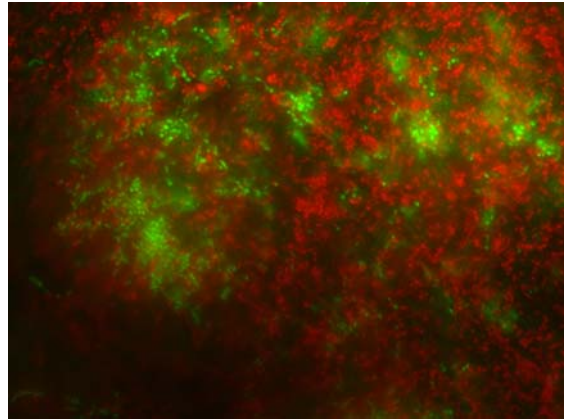


Abb. 4-48 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines 48 h Prüfkörpers mit einem dichten Biofilm, der zum größten Teil aus toten Bakterien besteht (Laktobazillen-Zahnpasta)

Im Anschluss an die Fluoreszenzmikroskopie wurden einige Prüfkörper mithilfe der konfokalen Lasermikroskopie untersucht. Die Biofilme wurden in einzelnen Schichten dargestellt. Anhand der gewonnenen Bilder ließen sich die Placebo- und die Verum-Prüfkörper auf unterschiedliche Zusammensetzungen der Biofilme untersuchen. Alle dargestellten Biofilme (verum und placebo) wiesen mit einem großen Anteil an Kokken und vereinzelt Stäbchen den gleichen Aufbau auf. Auch das Rot-Grün-Verhältnis war auf beiden Seiten vergleichbar. Die nachfolgenden Bilderserien (4-49 und 4-50) zeigen die einzelnen Schichten des Biofilms für einen Verum- und für einen Placebo-Prüfkörper.

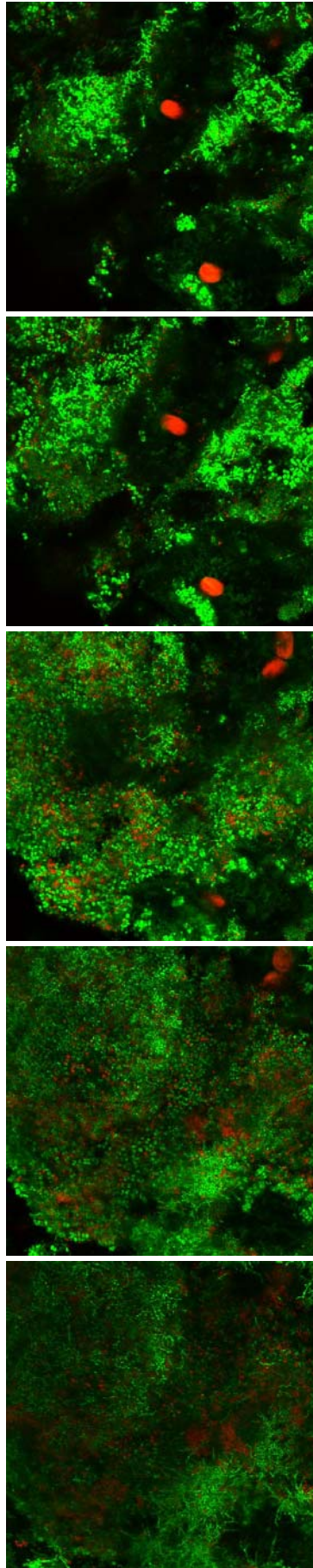


Abb. 4-49
CLSM Schicht-
bilder 48h Prüf-
körper der Pla-
cebo-Zahnpasta

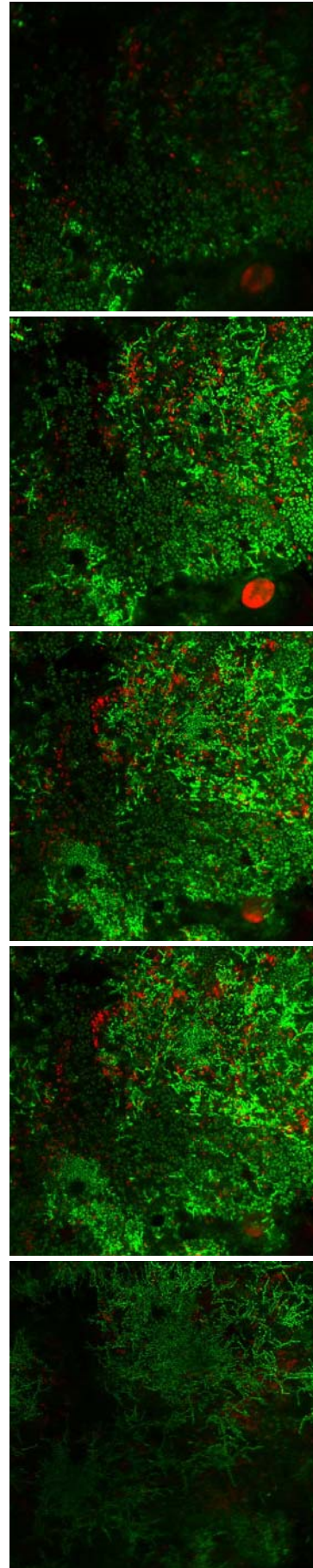


Abb. 4-50
CLSM Schicht-
bilder 48h Prüf-
körper der Ve-
rum-Zahnpasta

4.4 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Biofilme

Prüfkörper, die in der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung einen Score von 1 in Bezug auf das Rot-Grün-Verhältnis nach drei Minuten (sieben Prüfkörper) sowie nach 48 Stunden (10 Prüfkörper) aufwiesen, wurden für eine zusätzliche Untersuchung am Rasterelektronenmikroskop fixiert.

Die Analyse erfolgte, indem jeder der Prüfkörper quadrantenweise auf morphologische Besonderheiten untersucht wurde. Anschließend erfolgte analog zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung ein Vergleich der Placebo- und Laktobazillen-Prüfkörper. Dabei wurde der Anteil an stäbchenförmigen Bakterien in den Biofilmen berücksichtigt.

Prüfkörper nach 3-minütiger Exposition in der Mundhöhle:

Der Vergleich zwischen Placebo- und Laktobazillen-Prüfkörper ergab keine Unterschiede. Lediglich auf Laktobazillen-Prüfkörpern, auf denen Zahnpastarückstände zu sehen waren, konnten geringfügig mehr Stäbchen gezählt werden.



Abb. 4-51 REM-Aufnahme eines 3 Minuten in der Mundhöhle exponierten Prüfkörpers auf dem ein Stäbchen zu sehen ist (Placebo-Zahnpasta)

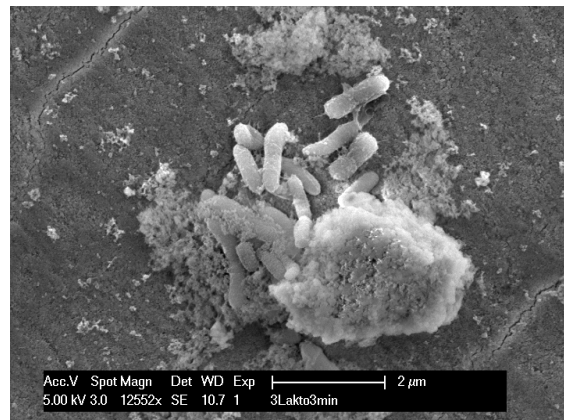


Abb. 4-52 REM-Aufnahme eines 3 Minuten in der Mundhöhle exponierten Prüfkörpers auf dem Zahnpastarückstände mit vereinzelt Stäbchen zu sehen sind (Verum-Zahnpasta)

Prüfkörper nach 48-stündiger Exposition in der Mundhöhle:

Sieben der untersuchten Biofilme zeigten keine Unterschiede bezüglich der morphologischen Zusammensetzung des Biofilms. Bei einem Probanden konnten auf dem Placebo-Prüfkörper

geringfügig mehr stäbchenförmige Bakterien als auf dem Laktobazillen-Prüfkörper entdeckt werden. Bei zwei weiteren Probanden konnten hingegen geringfügig mehr Stäbchen im Biofilm der Laktobazillen-Prüfkörper vorgefunden werden.

Aufgrund der eindeutigen Ergebnisse (ohne statistische Signifikanz) konnte auf die Auswertung der übrigen Prüfkörper verzichtet werden.

Die nachfolgenden REM-Aufnahmen dienen der Veranschaulichung der zuvor aufgeführten Ergebnisse:

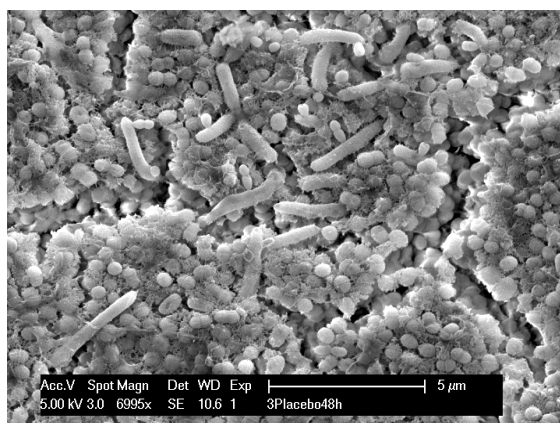


Abb. 4-53 REM-Aufnahme eines 48 h alten Biofilms, indem einige Stäbchen zu sehen sind (Placebo-Zahnpasta)

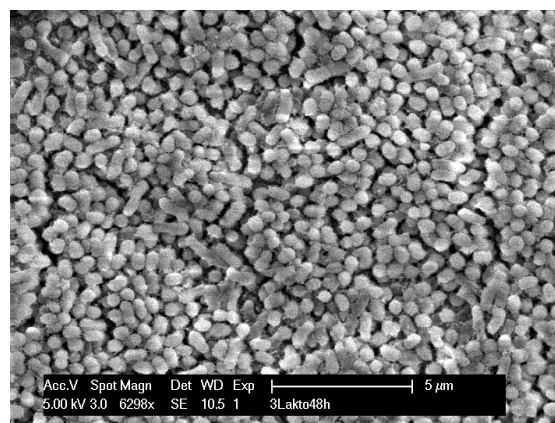


Abb. 4-54 REM-Aufnahme eines 48 h alten , aus Kokken bestehenden Biofilms (Laktobazillen-Zahnpasta)

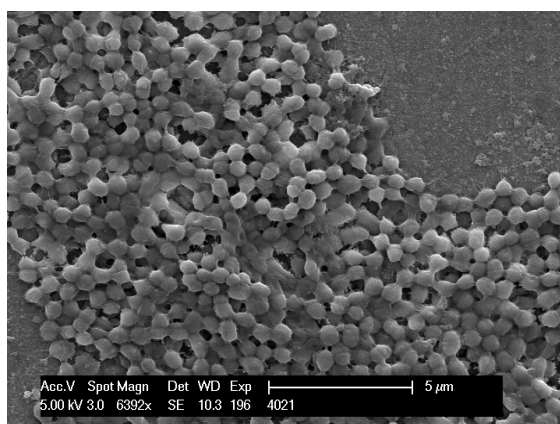


Abb. 4-55 REM-Aufnahme eines 48 h alten , aus Kokken bestehenden Biofilms (PlaceboZahnpasta)

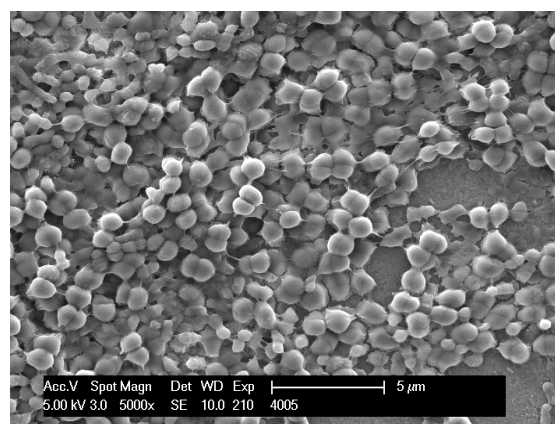


Abb. 4-56 REM-Aufnahme eines 48 h alten , aus Kokken bestehenden Biofilms (Laktobazillen-Zahnpasta)

Die zuvor am Fluoreszenzmikroskop sichtbaren Zahnpastarückstände waren auch am Raster-elektronenmikroskop sichtbar. Die Stäbchenaggregationen zeigen jedoch keine Verbindung zu Kokken oder anderen Bakterien.

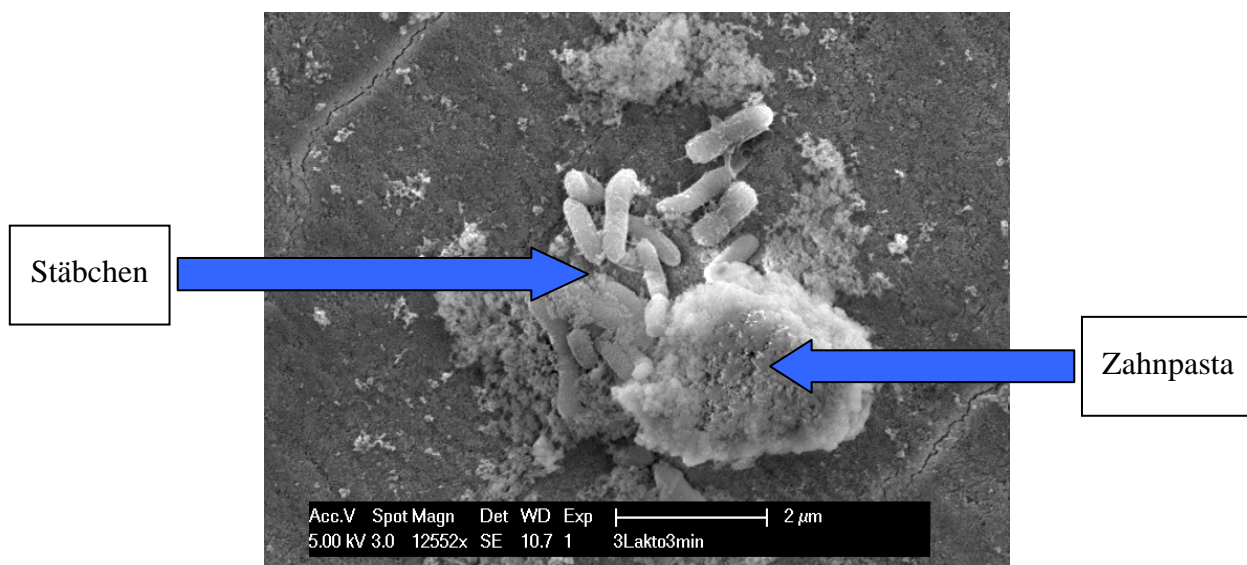


Abb. 4-57 REM-Aufnahme eines Prüfkörpers nach 3-minütiger Exposition (Zahnpastarückstände mit Stäbchenaggregationen)

4.5 Ergebnisse der PCR

Die Ergebnisse der Bestimmung der 16S rRNA-Gen-Kopienanzahl wurden als dekadischer Logarithmus berechnet und numerisch dargestellt. Da in jedem Bakterium mehrere Kopien des 16S rRNA-Gens vorhanden sind, diese Anzahl jedoch zwischen den verschiedenen Spezies differiert, wird auch die absolute Anzahl der Genkopien präsentiert. Zusätzlich wurden die prozentualen Anteile der 16S rDNA Kopien des *S. mutans* im Verhältnis zur 16S rDNA-Gesamtkopienanzahl errechnet.

Die Ergebnisse zeigten im Mittelwert eine Abnahme der Messwerte für *S. mutans*. Der statistische Vergleich belegte jedoch, dass dieser Unterschied nicht signifikant ist. Die Analyse der Einzelergebnisse zeigt, dass der arithmetische Mittelwert vor allem durch einen stark abnehmenden Wert für Proband 15 beeinflusst wird. Auch durch den Vergleich der logarithmierten Werte wird deutlich, dass kein Unterschied existent ist. Die Unterschiede der Messwerte der arithmetischen Mittel für Gesamtbakterien und für den prozentualen Anteil von *S. mutans* am Biofilm sind ebenfalls statistisch nicht signifikant.

Abb. 4-58 Übersichtstabelle aller Probanden: Keimzahlen *S.mutans*

Proband	<i>S.mutans</i> Placebo	<i>S.mutans</i> Verum	<i>S.mutans</i> Placebo log	<i>S.mutans</i> Verum log	Veränderung +/-/=
1	1,3 x 10 ¹	6,7 x 10 ⁰	1,12	0,82	-
2	1,3 x 10 ¹	1,3 x 10 ¹	1,12	1,12	=
3	0	0	0,00	0,00	=
4	8,7 x 10 ¹	0	1,94	0,00	-
5	1,3 x 10 ³	1,1 x 10 ²	3,11	2,05	-
6	2,0 x 10 ¹	5,3 x 10 ¹	1,30	1,73	+
7	1,3 x 10 ²	2,9 x 10 ²	2,12	2,47	+
8	1,2 x 10 ²	3,2 x 10 ³	2,08	3,50	+
9	1,2 x 10 ²	1,3 x 10 ²	2,08	2,12	+
10	8,0 x 10 ¹	4,2 x 10 ²	1,90	2,62	+
11	3,3 x 10 ¹	1,4 x 10 ²	1,52	2,15	+
12	6,7 x 10 ⁰	3,3 x 10 ¹	0,82	1,52	+
13	8,0 x 10 ¹	5,3 x 10 ¹	1,90	1,73	-
14	2,0 x 10 ¹	6,0 x 10 ¹	1,30	1,78	+
15	4,4 x 10 ⁴	4,3 x 10 ³	4,64	3,63	-
16	1,6 x 10 ²	2,7 x 10 ¹	2,20	1,43	-
17	6,3 x 10 ²	2,5 x 10 ²	2,80	2,39	-
18	9,3 x 10 ¹	1,3 x 10 ¹	1,97	1,12	-
Mittelwert	2,61 10³	5,02 x 10²	1,89	1,79	- (n.s.)

Abb. 4-59 Übersichtstabelle aller Probanden: Keimzahlen der Gesamtbakterien

Proband	Gesamtbakterien Placebo x 10⁴	Gesamtbakterien Verum x 10⁴	Gesamtbakterien Placebo log	Gesamtbakterien Verum log	Veränderung +/-/=
1	6,8	0,2	4,83	3,30	-
2	12	0,1	5,08	3,00	-
3	96	0,5	5,98	3,70	-
4	23	0,47	5,36	3,67	-
5	89	9,8	5,95	4,99	-
6	140	250	6,15	6,40	+
7	33	1,4	5,52	4,15	-
8	26	10	5,41	5,00	-
9	32	87	5,51	5,94	+
10	22	41	5,34	5,61	+
11	0,74	4	3,87	4,60	+
12	1,6	100	4,20	6,00	+
13	33	220	5,52	6,34	+
14	64	14	5,81	5,15	-
15	57	46	5,76	5,66	-
16	170	190	6,23	6,28	+
17	7,8	48	4,89	5,68	+
18	42	90	5,62	5,95	+
Mittelwert	47,5522	618038	5,39	5,08	- (n.s.)

Abb. 4-60 Übersichtstabelle aller Probanden: Keimzahlen Anteil S.mutans an

Gesamtbakterien

Proband	Anteil <i>S.mutans</i> an Gesamtbakterien Placebo	Anteil <i>S.mutans</i> an Gesamtbakterien <i>Verum</i>	Veränderung +/-/=
1	0,020%	0,333%	+
2	0,011%	1,333%	+
3	0,000%	0,000%	=
4	0,038%	0,000%	-
5	0,146%	0,116%	-
6	0,001%	0,002%	+
7	0,040%	2,095%	+
8	0,046%	3,173%	+
9	0,038%	0,015%	-
10	0,036%	0,102%	+
11	0,450%	0,350%	-
12	0,042%	0,003%	-
13	0,024%	0,002%	-
14	0,003%	0,043%	+
15	7,739%	0,926%	-
16	0,009%	0,001%	-
17	0,812%	0,051%	-
18	0,022%	0,001%	-
Mittelwert	0,527%	0,475%	- (n-s.)

4.6 Nachuntersuchungen

4.6.1 Wirkung unterschiedlicher Laktobazillenkonzentrationen

Insgesamt nahmen drei Probanden an dem Nachversuch zur Untersuchung der Wirkung unterschiedlicher Laktobazillenkonzentrationen einer Spüllösung teil. Proband 1 spülte mit 200 mg Laktobazillen-Pulver pro 20 ml NaCl, Proband 2 mit 20 mg Laktobazillen-Pulver pro 20 ml NaCl und Proband 3 erhielt nur 20 ml NaCl.

Insgesamt wurden drei Kariesrisikotests durchgeführt: eine Stunde vor der Spülung, direkt nach der Spülung und der letzte eine Stunde danach. Die unten aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass es keinerlei Unterschiede zwischen der Menge an *S. mutans* vor und nach der Spülung gibt.

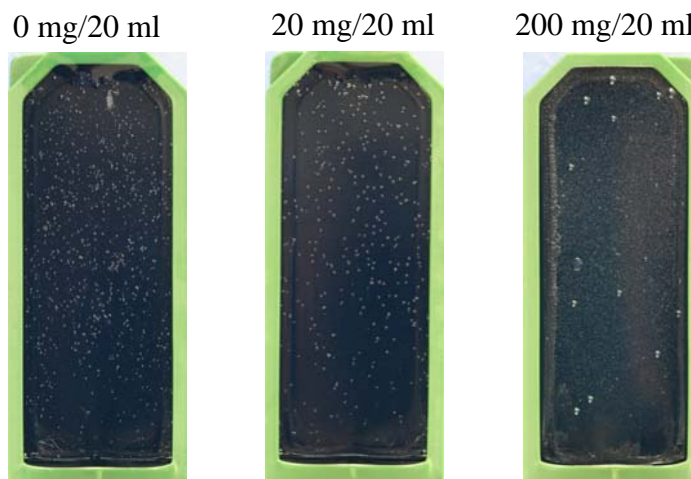


Abb. 4-61 1 Stunde vor Versuchsbeginn

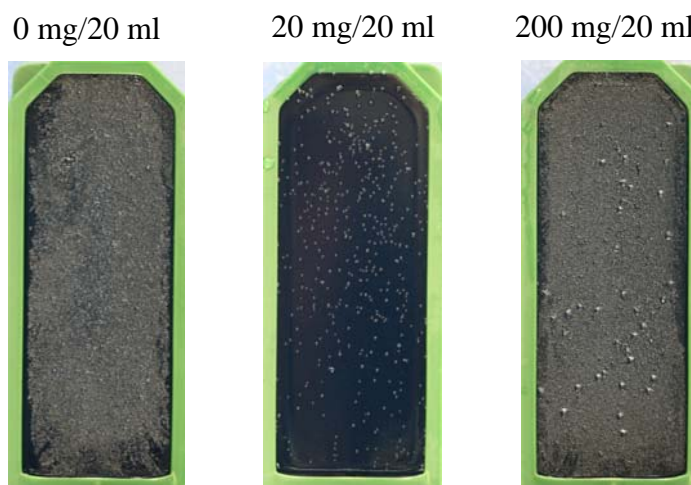
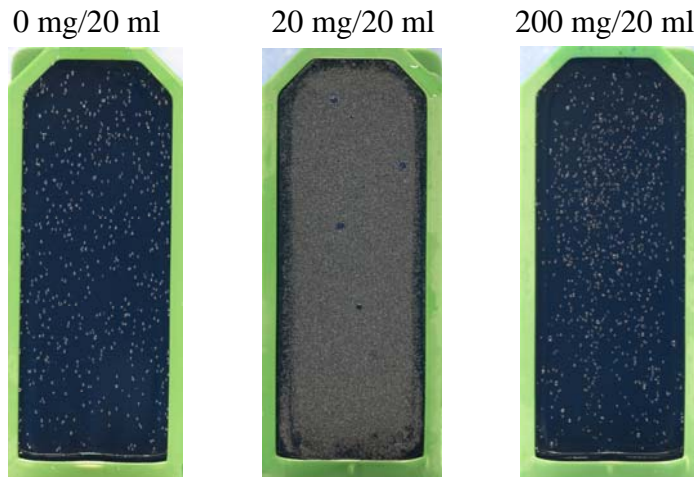


Abb. 4-62 Direkt nach der Spülung



**Abb. 4-63 1 Stunde
nach Versuchsbeginn**

Der graue Schleier, der auf drei der CRTs zu sehen ist, entsteht durch Wachstum anderer Bakterien auf dem Agar. Zu berücksichtigen sind hier lediglich die kleinen, weißen Kolonien (*S. mutans*).

Nachfolgend sind die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen dargestellt. Die verschiedenen Laktobazillenkonzentrationen lassen sich deutlich anhand des unterschiedlichen Rot-Anteils erkennen. Trotz der vielen erkennbaren Laktobazillen in Abbildung Abb. 4-64 gewinnt man den Eindruck, dass die Kolonie aus lebenden Bakterien (grün) keine Verbindung mit den Laktobazillen eingeht. Vielmehr aggregieren die Laktobazillen untereinander.

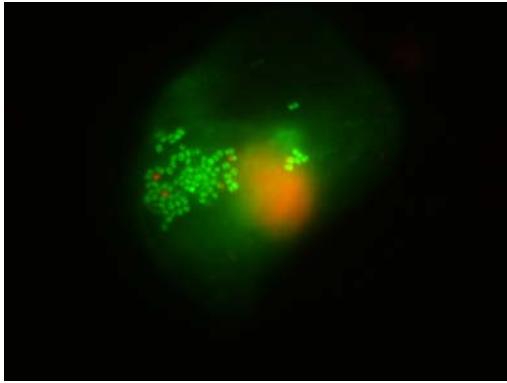
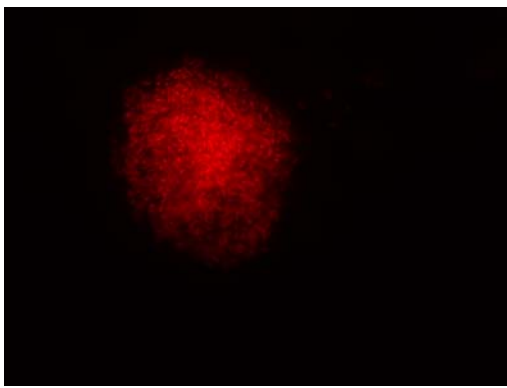
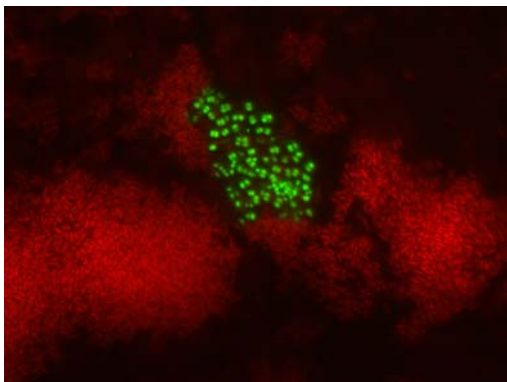


Abb. 4-64 Spülung mit reinem NaCl:
Keine roten (toten) Bakterien zu erkennen.
Zu sehen ist eine Epithelzelle, auf der sich
lebende Bakterien angesiedelt haben.



**Abb. 4-65 Spülung mit 20 mg Pulver / 20
ml NaCl:** Kolonie aus roten Stäbchen
(vermutlich *L. paracasei*) zu erkennen.
Keine Aggregation von lebenden Kokken
sichtbar.



**Abb. 4-66 Spülung mit 200 mg Pulver / 20
ml NaCl:** viele rote Stäbchen (vermutlich
L. paracasei) zu sehen. In der Mitte des
Bildes befindet sich eine Kolonie aus le-
benden Kokken, die jedoch keine Verbin-
dung zu den toten Bakterien zu haben
scheint.

4.6.2 Untersuchung des Zahnpasta-Expektorats

Um mögliche Aggregationen zwischen *L. paracasei* und *S. mutans* direkt nach Anwendung der Zahnpasta darzustellen, wurde von zwei Probanden das Zahnpasta-Speichel-Gemisch nach dem Zähneputzen aufgefangen, zentrifugiert und nach Anfärbung unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. In manchen Fällen konnten, wie unten dargestellt, lebende Bakterienkolonien in Verbindung mit toten Bakterien beobachtet werden. Dies war allerdings im Expektorat beider Zahnpasten zu beobachten, sodass nicht sicher davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei den roten Bakterien wirklich um die gesuchten Laktobazillen handelt.

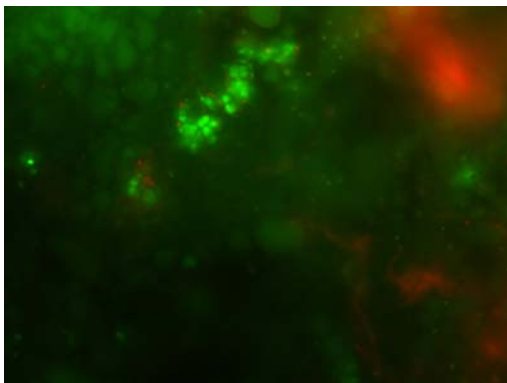


Abb. 4-67 Zahnpasta-Expektorat der Verum-ZP. Kolonie aus lebenden Bakterien ohne Verbindung zu toten Stäbchen

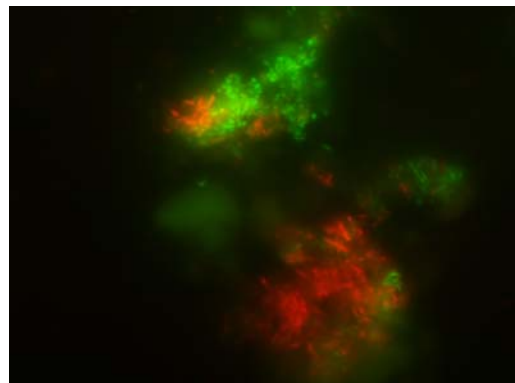


Abb. 4-68 Zahnpasta-Expektorat der Verum-ZP. Kolonie aus lebenden und toten Bakterien

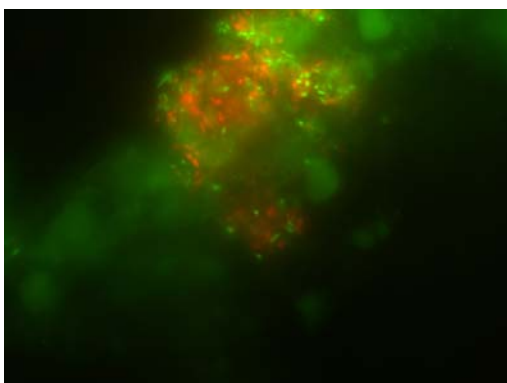


Abb. 4-69 Zahnpasta-Expektorat der Placebo-ZP. Kolonie aus lebenden und toten Bakterien

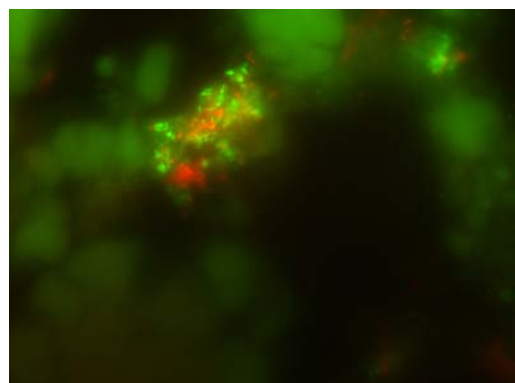


Abb. 4-70 Zahnpasta-Expektorat der Placebo-ZP. Kolonie aus lebenden und toten Bakterien

5 Diskussion

5.1 Diskussion von Material und Methode

5.1.1 Studiendesign und Fragestellung

In den letzten Jahrzehnten konnten zahlreiche wissenschaftliche Untersuchungen die gesundheitsfördernde Wirkung von Probiotika auf die Darmtätigkeit nachweisen (Cannon, 2011; Keller et al., 2011). Als probiotische Mikroorganismen werden Bakterien wie z.B. Bifidobakterien oder Laktobazillen eingesetzt, die auf unterschiedliche Art und Weise einen positiven Effekt auf den Organismus ausüben. Neben der Regulierung der Immunantwort ist die Konkurrenz mit pathogenen Keimen um Bindungsstellen bzw. die Wachstumshemmung bestimmter Bakterien ein wichtiger gesundheitsfördernder Mechanismus der Probiotika (Badet und Thebaud, 2008; Cannon, 2011; Hasslof et al., 2010).

Aufgrund dieser Wirkmechanismen entstand vor nicht allzu langer Zeit die Idee, kariespathogene Keime mithilfe von Probiotika zu bekämpfen, um auf diese Weise das Kariesrisiko zu reduzieren. Bislang existieren nur wenige Studien zu diesem Thema. In vielen Fällen handelt es sich um In-vitro-Studien, in denen die hemmende Wirkung probiotischer Bakterien (meistens Laktobazillen) auf pathogene Keime wie Mutans-Streptokokken nachgewiesen bzw. deren Koaggregationsverhalten untersucht werden (Hasslof et al., 2010; Keller et al., 2011; Lang et al., 2010). Andere Studien befassen sich damit, die Adhäsionsfähigkeit probiotischer Stämme an intraoralen Oberflächen zu beweisen (Haukioja et al., 2006). Klinische Studien zu diesem Thema, wie z.B. die von Näse et al. (2001), untersuchen die Wirkung einer probiotischen Milch über einen Zeitraum von sieben Monaten an Kindergartenkindern. Als Analysemethoden wurden klinische Untersuchungen sowie mikrobiologische Analysen von Plaque und Speichel durchgeführt.

Aufgrund der Tatsache, dass Laktobazillen durch ihr azidogenes und azidures Verhalten in tiefen kariösen Läsionen nachweisbar sind und sich am Kariesgeschehen aktiv beteiligen (Haukioja et al., 2006; Keller et al., 2011; Nase et al., 2001), wurde in der vorliegenden Studie im Gegensatz zu den klassischen „lebenden“ Probiotika hitzegetrocknete *Lactobacillus paracasei* verwendet.

Als Applikationsform wurde eine Zahnpasta gewählt, da die Zahnpflege eine alltäglich bekannte und für den Patienten gewohnte Methode darstellt. Neben mikrobiologischen Untersu-

chungen zur Bestimmung der *S. mutans*-Menge im Speichel wurde in dieser Studie ein besonderes Augenmerk auf die Biofilmbildung und -zusammensetzung gerichtet. Anhand fluoreszenzmikroskopischer und rasterelektronenmikroskopischer Analysen konnte auf Unterschiede in der Biofilmmorphologie sowohl initial (nach drei Minuten) als auch im etablierten Biofilm (nach 48 Stunden) zwischen Placebo- und Verum-Proben geachtet werden.

5.1.2 Art, Herstellung und Bearbeitung der Prüfkörper

Um eine Annäherung an die physiologischen Gegebenheiten zu gewährleisten, wurden in der vorliegenden Studie Prüfkörper aus Zahnschmelz verwendet. Netuschil et al. (1998) geben als Nachteil von Schmelzprüfkörpern gegenüber anderen Materialien, wie z.B. Glas, eine gewisse Eigenfluoreszenz an. Die postulierten Interferenzen, die dabei zu Problemen bei der Untersuchung des Biofilms am Fluoreszenzmikroskop führen sollen, konnten in dieser Studie jedoch nicht festgestellt werden, da die Eigenfluoreszenz lediglich auf bakterienfreien Prüfkörpern zu erkennen war.

Aufgrund der Tatsache, dass Rinderzähne sich strukturell nicht wesentlich von menschlichen Zähnen unterscheiden, wurden Prüfkörper aus bovinem Schmelz für die Biofilmbildung verwendet. Neben der besseren Verfügbarkeit der Rinderzähne spielen insbesondere ihre Homogenität und Kariesfreiheit eine wichtige Rolle. Die einheitliche Ernährung der Rinder führt zu einer vergleichbaren mineralischen Zusammensetzung und Fluoridierung der Zähne. Hinsichtlich der Mikrostruktur sowie der chemischen Hauptbestandteile Kalzium, Phosphor und Magnesium gibt es im Vergleich zu humanem Schmelz keine nennenswerten Unterschiede (Esser et al., 1998). Insbesondere die Größe der Prüfkörper mit Dimensionen von 4-5 x 4-5 mm wäre an humanen Zähnen nur schwer zu realisieren. Da zusätzlich zur Morphologie auch die Biofilmmenge auf einem Prüfkörper untersucht wurde, musste auf eine einheitliche Größe der Prüfkörper geachtet werden.

Untersuchungen am Rasterelektronenmikroskop beweisen, dass die initiale Biofilmbildung an Oberflächenunebenheiten, wie z.B. Rissen, Perikymatien oder Abrasionsdefekten vornehmlich beginnt. Grund hierfür ist der Schutz der Bakterien vor Scherkräften, die eine initiale Anheftung erschweren (McConnell et al., 2010; Quirynen und Bollen, 1995). Um sicherzustellen, dass alle Prüfkörper die gleiche Oberflächenbeschaffenheit aufweisen und damit auch die gleiche Voraussetzung für eine Biofilmbildung erfüllen, wurde eine Politur mit Nassschleifpapier bis zu einer Korngröße von 4000 grit durchgeführt.

5.1.3 Probandenselektion

An dieser explorativen Studie nahmen 18 Probanden teil. Vor Beginn der Studie wurden eine spezielle und allgemeine Anamnese erhoben, um systemische Erkrankungen auszuschließen, die Auswirkungen auf die Biofilmbildung haben könnten. So können zum Beispiel bestimmte Erkrankungen, Medikamente oder Bestrahlungen im Kopf-Hals-Bereich zur Reduktion der Speichelmenge bzw. zu Veränderungen der Speichelzusammensetzung führen (Bergdahl und Bergdahl, 2000; Leal et al., 2010). Dies wiederum könnte über eine veränderte Zusammensetzung der Pellikel zu einer gestörten Biofilmbildung führen. Um weiterhin gleiche Voraussetzungen für die Biofilmbildung zu gewährleisten, wurden nur Probanden mit einem kariesinaktiven Gebiss und unauffälligem Schleimhautbefund in die Studie einbezogen. Die Probanden durften ihren Essgewohnheiten nachgehen, sollten aber während der Versuchsdauer auf den Verzehr probiotischer Nahrungsmittel wie Joghurt oder Käse verzichten. Auch Alkohol und Zigarettenkonsum waren während dieser Zeit untersagt.

5.1.4 Biofilmgewinnung

Für die Gewinnung dentaler Biofilme stehen der Wissenschaft je nach Fragestellung verschiedene Methoden zur Verfügung. Mithilfe von In-Vitro-Biofilmmodellen können Mechanismen der Biofilmbildung, die Wirkung antimikrobieller Agenzien sowie eventuelle Resistenzentwicklungen der im Biofilm vorkommenden Bakterien unter Laborbedingungen untersucht werden. Für die Herstellung von In-Vitro-Biofilmen etablierten sich in den letzten Jahren zwei Verfahren: Das „mikrotiter plate-based model“ und das „flow displacement biofilm model“. Das „flow displacement biofilm model“ ist ein offenes System, in dem es zu einem ständigen Austausch zwischen frischem und verbrauchtem Wachstumsmedium kommt. Auf diese Weise werden Biofilme unter Einfluss von Scherbewegungen, wie sie z.B. durch die Speichelfließrate auch in der Mundhöhle existieren, gebildet. Mit dynamischen Modellen werden das Zusammenspiel von Bakterien sowie ihre Fähigkeit zum Quorum-sensing erforscht. Bei dem „mikrotiter plate-based model“ dagegen handelt es sich um ein geschlossenes System, bei dem der Biofilm statisch auf Kunststoffoberflächen wächst. Mit statischen Biofilmmodellen können verschiedene Parameter gleichzeitig mit einem geringeren Arbeitsaufwand untersucht werden (Coeyne und Nelis, 2010). Ein Vorteil der In-vitro-Biofilmmodelle wird in ihrer Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit gesehen, da im Unterschied zu In-Vivo-Untersuchungen keine individuellen Unterschiede auftreten. Dies ermög-

licht eine objektive Auswertung der Ergebnisse. Außerdem ist es möglich je nach Fragestellung die Untersuchungsparameter zu modifizieren (Wimpenny, 1982).

In-Vitro-Versuche stellen eine wichtige Untersuchungsmethode zur Erprobung kritischer Substanzen dar, die erst auf ihre Unverträglichkeit für den menschlichen Organismus getestet werden müssen. Da nach wie vor große Unterschiede zwischen der Bioadhäsion *in vitro* und *in vivo* bestehen (Tawakoli et al., 2012), erscheint es unabdingbar, nach erfolgreich durchgeführten In-vitro-Studien klinische Studien anzuschließen.

Die Laktobazillen, die in der vorliegenden Studie untersucht wurden, erwiesen sich bereits im Tierversuch sowie bei der Durchführung von In-vitro-Untersuchungen als wirksam in der Reduktion von Mutans Streptokokken (Lang et al., 2010; Tanzer et al., 2010). Anhand eines In-vivo-Modells soll nun erforscht werden, ob dies auch für den menschlichen Organismus zutrifft.

Mithilfe von Trägermaterialien ist es möglich, den Biofilm aus der Mundhöhle zu entnehmen, ohne seine Struktur zu zerstören. Es existieren verschiedene Methoden zur intraoralen Biofilmgewinnung. Eine Möglichkeit besteht darin, aus kieferorthopädischen Gründen zur Extraktion stehende Prämolaren zu verwenden (Al-Mulla et al., 2010). Die Zähne werden nach Versuchsabschluss extrahiert und für weitere Untersuchungen verwendet. Die Indikation ist allerdings sehr eingeschränkt, da die Manipulation mit der Zange den empfindlichen Biofilm zerstören würde. Meyerowitz et al. (1991) verwendeten als Trägermaterial Schmelzprüfkörper, die an kieferorthopädischen Brackets befestigt wurden. Als herausnehmbare Variante werden Teilprothesen bzw. Schienensysteme zur Fixierung von Prüfkörpern eingesetzt (Hahn et al., 1992; Laheij et al., 2010; Sreenivasan et al., 2009).

In der vorliegenden Studie wurden als Trägermaterial dünne Kunststoffschienen verwendet. Die Schienen sind im Unterschied zu aufgeklebten Brackets herausnehmbar, sodass die Probanden ihre gewohnten Mundhygienemaßnahmen durchführen konnten. Durch die grazile Gestaltung wird ein hoher Tragekomfort erreicht, der zur Probandencompliance beiträgt. Da in der vorliegenden Studie alle Probanden vollbezahnt sein sollten, kam eine Teilprothese als Trägermaterial für die Prüfkörper nicht in Frage.

Die Prüfkörper wurden mithilfe eines A-Silikons auf Aufbissschienen befestigt. Um Scherbewegungen durch die Wange oder den Spüleffekt des Speichels, die beide die Biofilmbildung beeinflussen könnten, zu minimieren, wurden die Prüfkörper so in das Silikon eingedrückt, dass sich zirkulär ein kleiner Wulst ausbildete. Die mit Prüfkörpern bestückten Schie-

nen wurden über einen Zeitraum von 48 Stunden getragen, da nach dieser Zeit bereits ein ausgereifter Zustand der Plaque zu erwarten ist (Lie, 1977; Netuschil et al., 1996).

5.1.5 Untersuchung des Biofilms

Die Untersuchung des Biofilms erfolgte unter Zuhilfenahme verschiedener Verfahren.

Fluoreszenzmikroskopie (live-dead-staining)

Die Fluoreszenzmikroskopie stellt eine etablierte Methode zur Untersuchung des Einflusses antimikrobieller Substanzen auf den Biofilm dar. Insbesondere die Möglichkeit, direkt Effekte zu analysieren, ohne vorher aufwändige Maßnahmen vorzunehmen, kann als wichtiger Vorteil angesehen werden (Arweiler et al., 2002).

Das in dieser Studie verwendete LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit enthält zwei Nukleinsäure-Farbstoffe: das rot fluoreszierende *Propidiumiodid* und das grün fluoreszierende *Syto 9 green*, die beide die Fähigkeit besitzen sich in doppelsträngige DNA einzulagern. Syto 9 ist in der Lage, alle Zellen anzufärben, wohingegen Propidiumiodid nur in Zellen eindringen kann, die keine intakte Membran mehr besitzen, um dort die Wirkung von Syto 9 aufzuheben. Auf diese Weise fluoreszieren lebende Bakterien grün, tote Bakterien dagegen rot (Berney et al., 2007; Boulos et al., 1999). Es existieren weitaus mehr Farbstoffe zur Anfärbung lebender und toter Mikroorganismen, die beiden zuvor erwähnten haben sich jedoch in der Untersuchung oraler Streptokokken besonders bewährt (Decker, 2001).

Mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie sollte ein denkbarer Unterschied in der Verteilung des Rot-Grün-Verhältnisses zwischen den Biofilmen der Placebo- und Verum-Prüfkörpern untersucht werden. Ein höherer Rot-Anteil des Biofilms der Verum-Prüfkörpern im Vergleich zum Biofilm der Placebo-Prüfkörper könnte einen Hinweis auf eingelagerte Laktobazillen geben. Ein gewisser Rot-Anteil ist in 48 Stunden alten Biofilmen zu erwarten. Die tiefen sowie die äußeren Schichten eines ausgereiften Biofilms scheinen weniger vitale Mikroorganismen aufzuweisen als zentrale Anteile.

Es wurde festgestellt, dass totes biologisches Material ein gutes Adhärenzvermögen an die Zahnhartsubstanz aufweist, was die tiefen, devitalen Anteile erklären könnte (Auschill et al., 2001). Die äußeren Schichten dagegen bestehen aus Bakterien, die den ständigen antibakteriellen Mechanismen des Speichels ausgesetzt sind (Scannapieco, 1994).

Die Fluoreszenzmikroskopie erlaubt jedoch nur die Differenzierung toter und lebender Bakterien sowie die Unterscheidung zwischen Kokken und Stäbchen. Bakterienspezies lassen sich mithilfe dieser Methode nicht bestimmen. Auch die Unterscheidung zwischen oberflächlichen und tiefen Plaqueschichten ist mit diesem Mikroskop nicht möglich (Arweiler et al., 2002).

Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

In Anlehnung an die Fluoreszenzmikroskopie wurden einige der Biofilme nach Behandlung mit *Syto 9 green* und *Propidiumiodid* im CLSM untersucht. Wie schon die Fluoreszenzmikroskopie bietet die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie den Vorteil, Proben ohne komplizierte Vorbehandlung und Fixierung untersuchen zu können (Davey und O'toole, 2000; Lawrence et al., 1991). So bleiben die Biofilme frei von Strukturschäden (Arweiler et al., 2002; Grötz et al., 1995). Zusätzlich zu der Untersuchung am Fluoreszenzmikroskop besteht hier die Möglichkeit, ähnlich der Computertomographie mithilfe eines Lasers dünne definierte Schichten durch den Biofilm darzustellen (Netuschil et al., 1998). Auf diese Weise konnte untersucht werden, inwiefern sich die Biofilme der Placebo- und Verum-Prüfkörper in tieferen Schichten unterscheiden. Auch hier stellte ein höherer Rot-Anteil des Biofilms ein Hinweis auf eingelagerte Laktobazillen dar.

Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie wurde unterstützend zur Fluoreszenzmikroskopie für die morphologische Untersuchung der Biofilme angewandt. Die aufwändige Vorbereitung der Proben durch Fixierung und Dehydrierung sowie die problematische Bestimmung der Bakterienspezies im REM begründen, weshalb die Rasterelektronenmikroskopie nicht als alleinige Methode für die Untersuchung von Biofilmen genutzt werden sollte (Hannig et al., 2010).

Verum-Proben, die bereits unter dem Fluoreszenzmikroskop Auffälligkeiten zeigten, wurden bei Vergrößerungen bis zu 20.000 betrachtet und mit Placebo-Biofilmen verglichen. Anhand der Untersuchung sollte kontrolliert werden, ob eine Korrelation zwischen den erhöhten Rot-Anteilen im Fluoreszenzmikroskop und der Anwesenheit morphologisch auffälliger Stäbchen in den Biofilmen besteht. Eine sichere Identifikation der probiotischen Laktobazillen ist nicht möglich. Die Untersuchung basiert lediglich auf dem Vergleich der Biofilmmzusammensetzung zwischen Placebo und Verum.

Mikrobiologische Untersuchungen

Zusätzlich zu den mikroskopischen Untersuchungen des Biofilms erfolgten eine mikrobiologische Analyse in Form von Abklatschpräparaten der intraoral exponierten Prüfkörper sowie ein Ausstrich der approximalen Plaque. Speichelproben, die ebenfalls auf das Vorhandensein von *S. mutans* untersucht wurden, ergänzten die Analyse.

Je nach Lokalisation der Plaque in der Mundhöhle kann es bezüglich des proportionalen Anteils an Mutans-Streptokokken im Biofilm zu Schwankungen um das 10.000-Fache kommen. *S. mutans* bevorzugen retentive Stellen als Standort (Loesche et al., 1975), sodass sie approximal oder in Fissuren in größeren Mengen vorzufinden sind als auf Glattflächen (bukkal) (Lindquist und Emilson, 1991). Aufgrund dieser Tatsache wurde in der vorliegenden Studie neben Abklatschpräparaten der Prüfkörper, die aufgrund ihrer Lokalisation eher einer Glattfläche entsprechen, zusätzlich proximale Plaque mithilfe einer kleinen Bürste („Microbrush“) entnommen. Da *S. mutans* innerhalb der Mundhöhle in unterschiedlichen Konzentrationen im dentalen Biofilm vorkommen, erfolgte die Plaqueentnahme immer an den gleichen Zahnzwischenräumen (Van Houte und Green, 1974). Die Plaque wurde ohne Zeitverzug auf die Agarplatte aufgetragen und direkt inkubiert, um mögliche Beeinflussungen des bakteriellen Wachstums durch zu lange Wartezeiten zwischen der Entnahme und der Inkubation zu vermeiden (Loesche et al., 1975).

Eine mikrobiologische Untersuchung ist nur bei kultivierbaren Bakterien sinnvoll (Hannig et al., 2010). Dies betrifft allerdings nur 50% der oralen Bakterien (Tawakoli et al., 2012). Zum Nachweis von *S. mutans* wird standardmäßig der Mitis-Salivarius-Agar mit Bacitracin verwendet. Bacitracin ist ein Polypeptidantibiotikum, gegen das Mutans-Streptokokken resistent sind. Die meisten Mikroorganismen werden durch diese Substanz jedoch am Wachstum gehindert. Neben Bacitracin sorgen Saccharose sowie verschiedene Salze für die hohe Selektivität des Anzuchtmediums (Gold et al., 1973; Jordan et al., 1987). Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass bei unverdünnten Speichel- und Plaqueproben, wie sie in diesem Versuch verwendet wurden, auch Enterokokken und Hefen auf dem Agar angezüchtet werden (Jordan et al., 1987). Auch wenn deren Aussehen sich von den Kolonien der Mutans Streptokokken unterscheiden, erschweren sie bei großem Aufkommen die Auszählung.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde als Ergänzung der mikrobiologischen Untersuchungen herangezogen. Die Methode weist neben der DNA vitaler Keime auch die Erbinformation avitaler Organismen nach, und hat sich für den Nachweis von *S. mutans* im Speichel etabliert (Rupf et al., 1999a).

Ziel war die Messung des Einflusses auf den initialen Biofilm. Bei einer Hemmung von *S. mutans* durch die Zahnpasta wäre eine Reduktion der Keimzahl in der Speichelflora zu erwarten, somit stünden weniger Keime für die Besiedlung zur Verfügung. Bei Behinderung der *S. mutans*-Proliferation durch Agglutination durch Laktobazillen wäre die Vermehrung im Biofilm gehemmt.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Plaque- und Gingiva-Indices

Die Erhebung der Plaque- und Gingiva-Indices diente der Erfassung der Plaquemenge und der Entzündungszeichen der Gingiva während des Versuchs. Insgesamt erfolgten drei Untersuchungen: Die ersten Indices wurden vor Beginn des Versuchs als Referenzwert erhoben. Darauf folgten zwei weitere direkt nach der Auswaschphase und einer am Ende des Versuchs.

Der Verzicht auf Mundhygienemaßnahmen führt nach nur wenigen Tagen zu ersten Entzündungszeichen der Gingiva. Umgekehrt kommt es nach Entfernung der Plaque nach kurzer Zeit zu einem Rückschritt der initialen, reversiblen Gingivitis (Hellwig et al., 2006a). Im Vordergrund steht dabei die mechanische Eliminierung der Plaque durch die Verwendung einer Zahnbürste. Eine weitere Bedeutung haben plaquehemmende Wirkstoffe wie Chlorhexidin, Sanguinarin, Amyloglukosidase, Triclosan usw., die in handelsüblichen Zahnpasten enthalten sind (Hellwig et al., 2006a).

Die Placebo- und die Verum-Zahnpasta enthielten bis auf die hitzeinaktivierten Laktobazillen identische Bestandteile. Um die Wirkung der Laktobazillen ohne die Beeinflussung anderer Substanzen untersuchen zu können, waren den Zahnpasten keine der zuvor erwähnten plaquehemmenden Wirkstoffe zugesetzt. Lediglich geringe Mengen an Natriumfluorid (Kariostatikum) sind in beiden Zahnpasten zu finden.

Die Ergebnisse zeigten sowohl für die Placebo- als auch für die Verum-Zahnpasta einen geringfügigen kontinuierlichen Anstieg der Werte. Die Plaque-Indices stiegen bei der Anwendung der Placebo-Zahnpasta von 11,3 % Plaqueanteil auf 16,3% an. Nach Anwendung der

Verum-Zahnpasta gab es einen Anstieg von 8,9% auf 12,75%. Diese geringfügige Verschlechterung der Werte zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied. Eine mögliche Ursache für dieses Ergebnis kann der Verzicht auf weitere Mundhygieneartikel, wie zum Beispiel Mundspüllösungen sein.

Bei den Gingiva-Indices zeigte sich ein anderes Phänomen: Nachdem es zunächst zu einer Verbesserung der Werte gekommen war, stiegen diese bis zum Versuchsende wieder an, so dass auch hier eine minimale Verschlechterung der Ergebnisse ohne statistische Signifikanz das Resultat war. Die plötzlich eintretende Verbesserung kann eine Folge der professionellen Zahnreinigung sein, die eine Woche zuvor durchgeführt wurde.

5.2.2 Fluoreszenzmikroskopie und konfokale Lasermikroskopie

Die Analyse der Prüfkörper unter dem Fluoreszenzmikroskop sollte Aufschluss über das Verhältnis von toten und lebenden Bakterien im Biofilm nach Anwendung der Placebo- und Verum-Zahnpasta geben. Zunächst erfolgte die Untersuchung der Verum-Zahnpasta ohne vorherige Kontamination mit Speichel, um eine Information über das Aussehen der probiotischen Laktobazillen im Fluoreszenzmikroskop zu erhalten. Hierbei fiel auf, dass die Konzentration der Bakterien in der Zahnpasta als eher gering zu werten war.

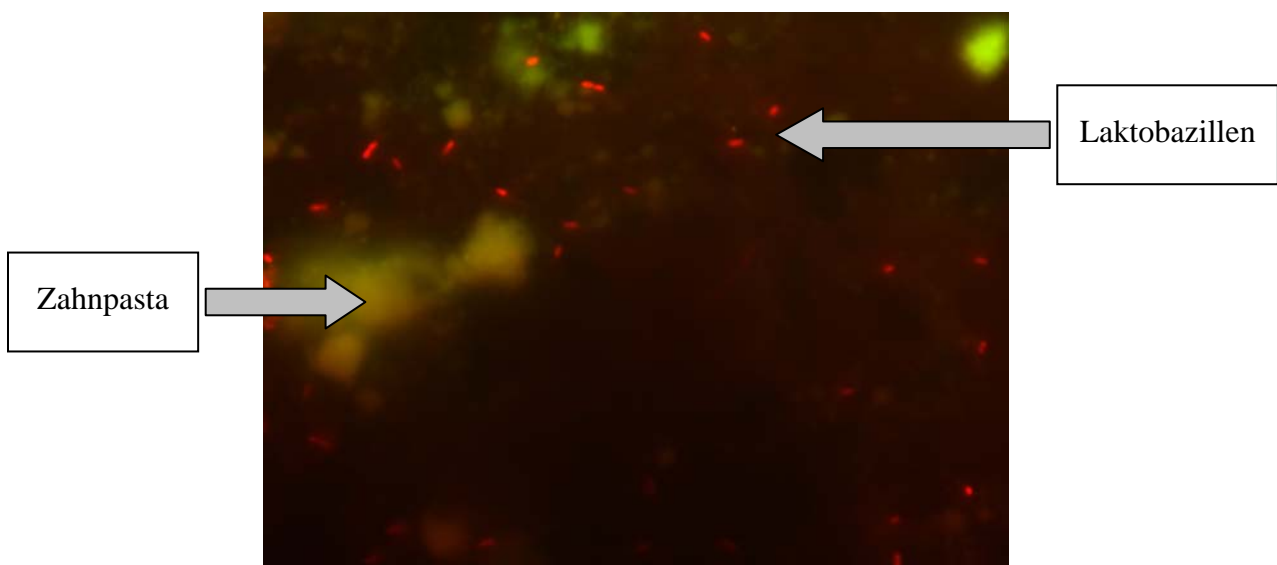


Abb. 5-1 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Verum-Zahnpasta (grün) mit Laktobazillen (rot)

Anhand des Scorings konnten nach dreiminütiger Exposition der Prüfkörper in der Mundhöhle keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Bakterienmenge auf den Placebo-

und den Verum-Prüfkörpern festgestellt werden. Gelegentlich waren auf den Verum-Prüfkörpern an Zahnpastaresten gebundene rote Stäbchen-Aggregationen zu sehen, die jedoch in keinerlei Verbindung zu anderen Bakterien (z.B. grünen Kokken) standen. Ob bei längerer Exposition eine Adhäsion an die Zahnhartsubstanz stattgefunden hätte und die Bakterien auf diese Weise als Wegbereiter für weitere Bakterienaggregationen gedient hätten, ist mit dieser Methode nicht nachweisbar.

Nach 48 Stunden konnte in zehn von insgesamt 18 Fällen ein höherer Rot-Anteil des Biofilms nach Anwendung der Verum-Zahnpasta festgestellt werden. Statistische Signifikanz zeigte dieses Ergebnis jedoch nicht. Ob es sich bei den rot dargestellten Bakterien um eingelagerte probiotische Laktobazillen handelt, kann anhand dieser Untersuchung nicht ermittelt werden. Eventuell handelt es sich bei den toten Bakterien um gewöhnlich im Biofilm vorkommende Mikroorganismen, die durch äußere Einflüsse getötet wurden. In einer Studie von Scannapieco (1994) wurde vermutet, dass die äußeren Biofilmschichten durch bakterizide Bestandteile des Speichels abgetötet werden. Fehler bei der Durchführung des Versuchs, die zum frühzeitigen Absterben der Mikroorganismen geführt haben könnten, sind eher unwahrscheinlich, da die Proben an vier verschiedenen Tagen (s. Versuchsaufbau) entnommen wurden. Die erhöhten Rot-Anteile tauchten in beiden Gruppen jeweils nur auf der Verum-Seite auf.

Da der Biofilm mit dem Fluoreszenzmikroskop nur oberflächlich untersucht werden konnte (Arweiler et al., 2002), wurde zusätzlich das Verfahren der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie angewandt. Mithilfe dieser Methode ist es möglich, den Biofilm in einzelnen, dünnen Ebenen darzustellen, sodass auch tiefere Schichten sichtbar gemacht werden können (Netuschil et al., 1998). Dadurch sollte festgestellt werden ob die *Lactobacillus paracasei*, ähnlich eines Pionierkeims, an die Pellikel binden und durch Aggregation weiterer Bakterien die Biofilmbildung sogar fördern können. In diesem Falle wären in tiefen Biofilmschichten der Verum-Prüfkörper Ansammlungen von roten Stäbchen mit gebundenen grünen Kokken zu erwarten gewesen. Die Ergebnisse zeigten jedoch keine Unterschiede im Aufbau des Biofilms zwischen Placebo- und Verum-Prüfkörpern. Allen gemeinsam war ein hauptsächlich aus Kokken bestehender Biofilm, in dem einzelne, gleichmäßig verteilte Stäbchen vorkamen. Der hohe Rot-Anteil, der im Fluoreszenzmikroskop festgestellt wurde, konnte hier nicht bestätigt werden.

Im Anschluss an die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Proben für die Untersuchung am Rasterelektronenmikroskop vorbereitet. Ziel dieses Verfahrens war die Untersuchung der Biofilmmzusammensetzung und -morphologie. Auch hier wurden die *Lactobacillus paracasei*-

Bakterien zunächst ohne vorherige intraorale Exposition untersucht, um diese morphologisch von anderen Stäbchen unterscheiden zu können. Auffällig hierbei war, dass die Laktobazillen in ihrer Struktur oft zerstört waren. Der Grund dafür liegt im Herstellungsprozess des probiotischen Präparats, bei dem die Bakterien hitzegetrocknet werden müssen.

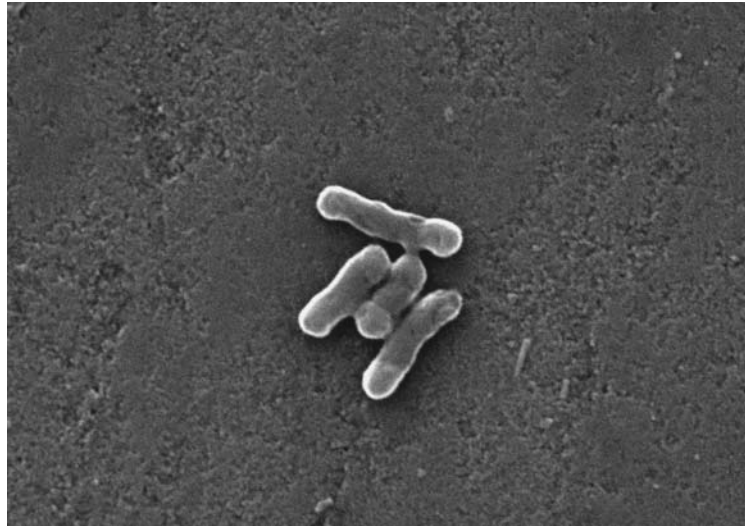


Abb. 5-2 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der *Lactobacillus paracasei*-Bakterien

Nach dreiminütiger Exposition waren, wie die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung bereits zeigte, keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Auch hier fand man auf wenigen Prüfkörpern Zahnpastarückstände mit Stäbchenaggregationen, die keinerlei Kontakt zu anderen Bakterien aufwiesen. Nach 48 Stunden waren hauptsächlich aus Kokken bestehende Biofilme mit vereinzelt Stäbchen erkennbar. Einen Unterschied zwischen Placebo und Verum konnte hierbei nicht festgestellt werden. Es ist nicht auszuschließen, dass es sich bei den roten Bereichen (Fluoreszenzmikroskopie) um locker an den Biofilm gebundene, pasteurisierte Laktobazillen handelte. Durch die vielen zur Fixierung notwendigen Spülvorgänge kann es bei schwacher Bindung zu einem Ablösen der Bakterien gekommen sein, sodass diese unter dem Rasterelektronenmikroskop nicht mehr zu sehen waren.

Da mithilfe der Mikroskopie nur Kokken und Stäbchen voneinander unterschieden, nicht aber mit Sicherheit das Vorkommen einer Bakterienart bestimmt werden kann, wurden mikrobiologische Analysen zum Nachweis von *S. mutans* durchgeführt. Die probiotischen Bakterien sollen die Fähigkeit besitzen, *S. mutans* zu aggregieren, sodass eine quantitative Reduktion dieser Bakterien im Speichel zu erwarten wäre. Je nach Wirkmechanismus könnte es im

Biofilm durch eingelagerte *L. paracasei* – *S. mutans*-Aggregationen zu einem Anstieg der Mutans-Streptokokken kommen. Umgekehrt könnte auch ein Abfall der Mutans-Streptokokken durch die erfolgreiche Reduktion der planktonisch im Speichel vorkommenden Bakterien die Folge sein. Zum Nachweis von *S. mutans* im Biofilm wurden Abklatschpräparate der Prüfkörper bzw. Ausstriche der approximalen Plaque eines bestimmten Approximalkontaktes durchgeführt. Die Auswertung ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Placebo- und den Verum-Proben. Auch die zu erwartende Reduktion der Mutans-Streptokokken im Speichel blieb aus. Nach Auszählung der Kolonien auf den Agarplatten war zwischen Placebo und Verum kein bedeutender Unterschied nach 14-tägiger Anwendung der Zahnpasten zu erkennen.

Da eine Hauptaufgabe einer Zahnpasta die Verminderung der Kariesprogression ist, wurde mittels molekularbiologischer Feinanalyse der *S. mutans*-Anteil im initialen Biofilm untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchung zeigten bei 17 von 18 Probanden das Vorhandensein von *S. mutans* im initialen Biofilm bei Anwendung der Placebo-Zahnpasta sowie für 16 von 18 Probanden bei Nutzung des Laktobazillen enthaltenden Präparats. Der statistische Vergleich der Ergebnisse ergab keine signifikanten Änderungen. Eine spezifische, antimikrobielle Wirkung gegen *S. mutans* durch die Laktobazillen enthaltende Zahnpasta ließ sich in dieser Untersuchung nicht nachweisen.

Die Fähigkeit, *S. mutans* (DMSZ 20523) durch den in dieser Studie untersuchten Bakterienstamm *L. paracasei* (DMSZ 16671) zu aggregieren, wurde 2010 in einer In-vitro-Studie von Lang et al. bewiesen. Dabei erzielte dieser Bakterienstamm in einer Suspension mit *S. mutans* aus 624 anderen Stämmen die stärkste Aggregation. Die vorliegende Bindung zeigte keine Beeinflussung durch äußere Faktoren, wie z.B. Speichelkontakt oder Proteasenaktivität. Eine Autoaggregation der Bakterien konnte nicht festgestellt werden. Auch die Bindung der Laktobazillen an Hydroxylapatit konnte in dieser Studie ausgeschlossen werden (Lang et al., 2010). Nach den vielversprechenden Ergebnissen dieser In-vitro-Studie untersuchten Tanzer et al. (2010) kurze Zeit später die Wirkung der probiotischen Laktobazillen (DSMZ 16671) in einem Tierexperiment an Ratten. Dabei wurden 20 von 40 Ratten mit dem Bakterienstamm *S. mutans* (10449S) infiziert. Jeweils die Hälfte dieser zwei Gruppen erhielt neben kariogener Nahrung pasteurisierte und gefriergetrocknete *L. paracasei* Bakterien (DSMZ 16671), sodass insgesamt vier Gruppen aus jeweils zehn Ratten entstanden. Nach 21 und 42 Tagen wurden Plaque-Proben mikrobiologisch auf *S. mutans* untersucht. Ziel der Analyse war der Vergleich der *S. mutans*-Menge im Biofilm der vier verschiedenen Gruppen. Beim Vergleich der mit

S. mutans infizierten Ratten konnte mit 40% weniger *S. mutans* für die Ratten mit der probiotischen Nahrung ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Auch die Kariesscores waren überzeugend: Die Ratten, die probiotisch ernährt worden waren, zeigten deutlich weniger Dentinkaries sowie Glattflächenkaries im Schmelz. Lediglich in den Fissuren war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Placebo und der probiotischen Ernährung zu vermerken (Tanzer et al., 2010).

In der vorliegenden In-situ-Studie konnten die oben aufgeführten Ergebnisse nicht bestätigt werden. Ein negativer Einfluss der Laktobazillen auf die Biofilmbildung wurde zwar nicht nachgewiesen, die erwartete Reduktion der Mutans-Streptokokken im Speichel und in der Plaque blieb aber aus. Nach 14-tägiger Anwendung der Zahnpasta hätte zumindest eine geringfügige Abnahme beobachtet werden müssen. Es wurden verschiedene Hypothesen für dieses Ergebnis aufgestellt:

Bei der Untersuchung der Verum-Zahnpasta fiel die geringe Menge an Laktobazillen auf. Es wurde vermutet, dass die Konzentration der in der Zahnpasta enthaltenen Bakterien nicht ausreichte, um *S. mutans* aus der Mundhöhle zu eliminieren. Es erfolgte eine Nachuntersuchung, in der drei Probanden verschiedene Konzentrationen einer Laktobazillen enthaltenden Spüllösung erhielten. Der erste Proband spülte mit 200 mg Laktobazillen enthaltendem Pulver in 20 ml NaCl, der zweite Proband erhielt eine Spüllösung mit 20 mg „Laktobazillenpulver“ auf 20 ml NaCl, der dritte spülte nur mit NaCl. Während des Versuchs wurden jeweils drei Speicheltests durchgeführt: eine Stunde vor Versuchsbeginn als Referenzwert, direkt nach dem Spülen, um die unmittelbare Wirkung der Laktobazillen zu untersuchen und eine Stunde nach der Spülung, um die Wirkungsdauer zu analysieren. Zusätzlich erfolgte eine Untersuchung am Fluoreszenzmikroskop zur Darstellung des Rot-Grün-Verhältnisses. Sowohl die Speichelanalyse als auch die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Expectorats erbrachten nicht die erwarteten Ergebnisse. Die Kolonienanzahl auf dem MSB-Agar war vor und nach dem Versuch vergleichbar. Im Fluoreszenzmikroskop waren grüne Bakterienkolonien ohne Verbindung zu roten Stäbchen zu sehen. Auffällig war jedoch das Bestreben der pasteurisierten Laktobazillen, untereinander Bakterienaggregationen auszubilden. Dieses Phänomen wurde bereits bei der Untersuchung der Mundspüllösung in der vorangegangenen Studie beobachtet, obwohl eine Autoaggregation der Laktobazillen in der Studie von Lang et al. (2010) ausgeschlossen wurde. Durch die Cluster-Bildung verringert sich die Gesamtoberfläche der Laktobazillen, sodass weniger Bindungsstellen für Mutans-Streptokokken zu Verfügung stehen können.

Speichel benetzt in der Mundhöhle alle Oberflächen, so auch Bakterien. Bestimmte Speichelbestandteile, wie z.B. Agglutinine, haben die Fähigkeit, an einen Rezeptor der Mutans-Streptokokken (zellwand-assoziiertes Adhäsins aus der Ag I/II Familie) zu binden und eine Aggregation der Bakterien untereinander zu initiieren (Ahn et al., 2008; Brady et al., 1992). Dieser Vorgang könnte eine mögliche Ursache für die verminderte Aggregationsfähigkeit der probiotischen Laktobazillen an *S. mutans* darstellen. In der Studie von Lang et al. (2010) wird zwar der negative Einfluss von Speichel auf die vorliegenden Bindungsmechanismen ausgeschlossen, da es sich aber um eine In-vitro-Studie handelte, kann nicht sichergestellt sein, dass alle in der Mundhöhle existierenden Faktoren imitiert werden konnten.

Im Unterschied zu der vorangegangenen Studie, in der die Wirkung einer *L. paracasei* DSMZ 16671 enthaltenden Spüllösung untersucht wurde, kam in der vorliegenden Untersuchung eine Zahnpasta zum Einsatz. Die hohe Viskosität der Zahnpasta, in der die Bakterien eingebettet waren, könnte verhindert haben, dass die Laktobazillen den Wirkort schnell genug erreichen. Dies würde bedeuten, dass die meisten Laktobazillen nach dem Zähneputzen mit der Zahnpasta wieder ausgespült wurden, ohne zuvor an Mutans-Streptokokken binden zu können. Doch allein die Konsistenz des Trägermaterials kann für die schlechte Wirkung der Laktobazillen nicht als Ursache herangezogen werden. Auch wenn in der ersten Studie im Vergleich zu der vorliegenden eine geringfügige Reduktion der Mutans-Streptokokken im Speichel zu erkennen war, so lag dies vermutlich an den verschiedenen Versuchsdesigns mit unterschiedlichen Zielsetzungen, die nur schwer miteinander vergleichbar sind. An der ersten Studie nahmen lediglich sechs Probanden teil. Die Wirkung der Spülung wurde über einen Zeitraum von 48 Stunden untersucht. Bei der vorliegenden Studie waren es 18 Probanden mit einer Versuchsdauer von zwei Wochen. In einer Studie von (Montalto et al., 2004), in der 35 Probanden Probiotika (Laktobazillen) sowohl in Kapselform als auch in flüssigem Zustand erhielten, konnte nach 45 Tagen, unabhängig vom zugeführten Medium, keine Reduktion der *S. mutans*-Anzahl im Speichel festgestellt werden. Umgekehrt stieg jedoch die Laktobazillenkonzentration an.

Die Probandenselektion könnte ebenfalls eine Rolle spielen. Es handelte sich bei den 18 Probanden größtenteils um junge Personen ohne Kariesaktivität. Die Kariesrisikotests wiesen in den meisten Fällen relativ geringe Mengen an *S. mutans* im Speichel auf, sodass auch nur wenige Bakterien aggregiert werden konnten. Eine höhere Konzentration hätte vermutlich zu einer größeren Reduktion der *S. mutans* geführt, ob sie aber ausgereicht hätte, um das Kariesrisiko zu minimieren, darüber kann nur spekuliert werden.

5.3 Schlussfolgerung

Zweifelloos stellt die Anwendung von Probiotika zur Reduktion oralpathogener Keime ein interessantes Konzept zur Bekämpfung der Karies und Parodontitiden dar.

Im Gegensatz zu Antibiotika sind bei der Anwendung von Probiotika keine Resistenzen zu erwarten (Bonifait et al., 2009; Meurman, 2005; Twetman und Stecksén-Blicks, 2008). Sowohl *in vitro* als auch im Tierexperiment konnten die hier untersuchten probiotischen Laktobazillen überzeugen und vielversprechende Ergebnisse im Hinblick auf die Reduktion von Mutans-Streptokokken aufzeigen.

Die Resultate der hier vorliegenden Studie lassen den Schluss zu, dass In-vitro-Untersuchungen nur bedingt auf den menschlichen Organismus übertragbar sind. Es existieren zu viele Faktoren, die außerhalb der Mundhöhle nicht simuliert werden können.

Da die Gruppe der Mutans-Streptokokken aus verschiedenen kariogenen Bakterienarten besteht, die sich jeweils aus verschiedenen Sero- bzw. Genotypen zusammensetzen (Caufield und Walker, 1989; Peralisi et al., 2010), wurde die Aggregation der probiotischen Laktobazillen in der Studie von Lang et al. (2010) mit verschiedenen Mutans-Streptokokken (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. rattus*, *S. cricetus* etc.) bzw. mit acht verschiedenen *S. mutans* Wildtypen (aus Probanden isoliert) untersucht. Das Aggregationsvermögen der Bakterien mit den Laktobazillen wurde jedoch immer nur mit einer Bakterienart gleichzeitig untersucht. Zahlreiche orale Mikroorganismen haben das Bestreben, mit anderen Bakterienarten eine Koaggregation einzugehen (Kitada und Oho, 2012; Kolenbrander et al., 1993). Es wäre also denkbar, dass das Aggregationsverhalten der pasteurisierten Laktobazillen durch die Anwesenheit anderer Bakterien, die eine größere Affinität zu *S. mutans* aufweisen, beeinflusst wird.

Neben Mutans-Streptokokken sind diverse Laktobazillen, Actinomyceten, Bifidobakterien, Propionibakterien sowie non-mutans Streptokokken am Kariesgeschehen beteiligt (Takahashi und Nyvad, 2011). Eine kurzzeitige Reduktion von Mutans-Streptokokken, wie sie in einigen Studien nach Probiotika-Einnahme festgestellt wird (Näse et al., 2001; Ahola et al., 2002; (Nikawa et al., 2004), muss demnach nicht zwangsläufig ein geringeres Kariesrisiko zur Folge haben (Twetman und Keller, 2012).

Des Weiteren könnte das angewandte Medium (Zahnpasta, Spüllösung) ein Problem darstellen. Beide Substanzen werden sehr schnell (max. 2 min) wieder aus der Mundhöhle entfernt,

sodass die meisten Laktobazillen direkt wieder mit dem Medium ausgeschieden werden, bevor sie die Möglichkeit haben, an den Wirkort zu gelangen. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu lösen, könnte die Anwendung sogenannter slow-release-Substanzen sein, die bereits in Form von Fluorid enthaltenden Vehikeln für die Kariesprävention (Bonner et al., 2006; Curzon und Toumba, 2004; Pessan et al., 2008) bzw. für die Behandlung der Parodontitis (lokale Antibiotika) (Eickholz, 2010; Tonetti et al., 2012) untersucht wurden. Ein Vorteil dieser Anwendung ist die kontinuierliche Abgabe der Laktobazillen über einen längeren Zeitraum (Stunden), um die Wirkdauer zu verlängern.

In einer Studie von Ausschill et al. (2001) wurde in einem In-vitro-Versuch festgestellt, dass vermehrt tote Streptokokken an die Prüfkörper adhärirten, während lebende Bakterien im flüssigen Medium verblieben. Es wurde daraus gefolgert, dass totes, biologisches Material ein wichtiger Faktor in der initialen Phase der Biofilmbildung darstellt (Auschill et al., 2001; Netuschil et al., 1998). So war ein Ziel der vorliegenden Studie die Untersuchung des Adhäsionsverhaltens der probiotischen Laktobazillen an die Pellikel bzw. an den etablierten Biofilm. Durch Bindung weiterer Mutans-Streptokokken hätte das Probiotikum durch Förderung der Biofilmbildung sogar kariesbegünstigende Wirkungen zeigen können. Dieses Phänomen konnte nicht vollständig ausgeschlossen werden, da die PCR-Ergebnisse bei einigen Probanden eine erhöhte Konzentration an Laktobazillen zeigten und die fluoreszenzmikroskopischen Bilder vermehrt tote Bakterien auf den Verum-Prüfkörpern erkennen ließen. Ein definitiver Beweis, ob es sich hierbei um die probiotischen Laktobazillen handelte bzw. ob sie dadurch die Adhäsion weiterer Mutans-Streptokokken begünstigten, konnte aber nicht erbracht werden.

Mit dem Konzept der antimikrobiellen Therapie wird das Ziel verfolgt, bestimmte kariesverursachende Mikroorganismen gezielt aus der Mundhöhle zu eliminieren, um so einen ökologischen Shift zu verursachen (Caufield et al., 2001). Im Idealfall wird auf diese Weise der einst kariogene Biofilm in einen nicht-kariogenen Biofilm umgewandelt. Der Eingriff in ein etabliertes Ökosystem birgt jedoch auch Gefahren. Es ist denkbar, dass die Elimination bestimmter schädlicher Mikroorganismen eine Nische für andere, bislang nicht so bedeutende kariogene Keime mit unbekannten Folgen freiwerden lässt.

Im Hinblick auf die zahlreichen offen gebliebenen Fragen werden noch mehr klinische Langzeitstudien zu diesem Thema nötig sein, ehe sich Probiotika als effektive, kariesreduzierende Substanzen zum Wohle des Patienten auf dem Markt etablieren können.

6 Literaturverzeichnis

1. Ahn SJ, Ahn SJ, Wen ZT, Brady LJ, Burne RA (2008) Characteristics of biofilm formation by streptococcus mutans in the presence of saliva. *Infect Immun* 76:4259-4268
2. Ahola AJ, Yli-Knuuttila H, Suomalainen T, Poussa T, Ahlström A, Meurman JH, et al. (2002) Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental risk factors. *Arch Oral Biol* 47:799-804
3. Al-Mulla A, Karlsson L, Kharsa S, Kjellberg H, Birkhed D (2010) Combination of high-fluoride toothpaste and no post-brushing water rinsing on enamel demineralization using an in-situ caries model with orthodontic bands. *Acta Odontol Scand* 68:323-328
4. Anwar H, Strap JL, Costerton JW (1992) Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 36:1347-1351
5. Arnold WH, Gängler P, Kalkuschke L (1998) Three-dimensional reconstruction of approximal subsurface caries lesions in deciduous molars. *Clin Oral Investig* 2:174-179
6. Arweiler NB, Auschill TM, Donos N, Sculean A (2002) Antibacterial effect of an enamel matrix protein derivative on in vivo dental biofilm vitality. *Clin Oral Investig* 6:205-209
7. Auschill TM, Artweiler NB, Netuschil L, Brex M, Reich E, Sculean A (2001) Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Arch Oral Biol* 46:471-476
8. Badet C, Thebaud NB (2008) Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. *Open Microbiol J* 2:38-48
9. Berg IC, Rutland MW, Arnebrant T (2003) Lubricating properties of the initial salivary pellicle--an AFM study. *Biofouling* 19:365-369
10. Bergdahl M, Bergdahl J (2000) Low unstimulated salivary flow and subjective oral dryness: association with medication, anxiety, depression and stress. *J Dent Res* 79:1652-1658

11. Berney M, Hammes F, Bosshard F, Weilenmann HU, Egli T (2007) Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* 73:3283-3290
12. Bonifait L, Chandad F, Grenier D (2009) Probiotics for oral health: myth or reality? *J Can Dent Assoc* 75:585-590
13. Bonner BC, Clarkson JE, Dobbyn L, Khanna S (2006) Slow-release fluoride devices for the control of dental decay (review). *Cochrane Database Syst Rev* 18:CD005101
14. Boulos L, Prevost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R (1999) LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods* 37:77-86
15. Bowen WH, Koo H (2011) Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res* 45:69-86
16. Brady LJ, Piacentini DA, Crowley PJ, Oyston PCF, Bleiweis AS (1992) Differentiation of salivary agglutinin-mediated adherence and aggregation of *mutans streptococci* by use of monoclonal antibodies against the major surface adhesin P1. *Infect Immun* 60:1008-1017
17. Burton JP, Wescombe PA, Cadieux PA, Tagg JR (2011) Beneficial microbes for the oral cavity: time to harness the oral streptococci? *Benef Microbes* 2:93-101
18. Caglar E, Kargul B, Tanboga I (2005) Bacteriotherapy and probiotics' role on oral health. *Oral Dis* 11:131-137
19. Cannon ML (2011) A Review of probiotic therapy in preventive dental practice. *Probiotics & Antimicro Prot* 3
20. Caufield PW, Dasanayake AP, Li Y (2001) The antimicrobial approach to caries management. *J Dent Educ* 65:1091-1095
21. Caufield PW, Walker TM (1989) Genetic diversity within *streptococcus mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphisms. *J Clin Microbiol* 27:274-278
22. Coeyne T, Nelis HJ (2010) In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *J Microbiol Methods* 83:89-105
23. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, et al. (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 41:435-464

24. Curzon ME, Toumba KJ (2004) In vitro and in vivo assessment of a glass slow fluoride releasing device: a pilot study. *Br Dent J* 196:543-546
25. Davey MA, O'toole GA (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:847-867
26. Decker EM (2001) The ability of direct fluorescence-based, two-colour assays to detect different physiological states of oral streptococci. *Lett Appl Microbiol* 33:188-192
27. Deimling D, Hannig C, Hoth-Hannig W, Schmitz P, Schulte-Monting J, Hannig M (2007) Non-destructive visualisation of protective proteins in the in situ pellicle. *Clin Oral Investig* 11:211-216
28. Donlan RM, Costerton JW (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15:167-193
29. Douglas CW (1994) Bacterial-protein interactions in the oral cavity. *Adv Dent Res* 8:254-262
30. Eickholz P (2010) Parodontale Therapie mit lokalen Antibiotika. *ZM* 100:54-62
31. Emilson CG, Krasse B (1985) Support for and implications of the specific plaque hypothesis. *Scand J Dent Res* 93:96-104
32. Erdem AP, Sepet E, Güven K, Trosola SC, Guven Y (2012) Effects of two fluoride varnishes and one fluoride/chlorhexidine varnish on streptococcus mutans and streptococcus sobrinus biofilm formation in vitro. *Int J Med Sci* 9:129-136
33. Eschrich K, Haak R, Kneist S, Merte K, Rupf S (2003) Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in der zahnmedizinischen Praxis. *Die Quintessenz* 10:1091-1100
34. Esser M, Tinschert J, Marx R (1998) Materialkennwerte der Zahnhartsubstanz des Rindes im Vergleich zur humanen Zahnhartsubstanz. *Dtsch Zahnärztl Z* 53:713-717
35. FAO/WHO (2002) Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London - Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002
36. Flemming HC, Wingender J (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8:623-633
37. Flemming HC, Wingender J (2001a) Biofilme - die bevorzugte Lebensform der Mikroorganismen. *Biologie in unserer Zeit* 31:2-13

38. Flemming HC, Wingender J (2001b) Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci Technol* 43:1-8
39. Folwaczny M, Hickel R (2003) Biofilm - Problem oder Perspektive? *Dtsch Zahnärztl Z* 58:648-659
40. Foster JS, Kolenbrander PE (2004) Development of a multispecies oral bacterial community in a saliva-conditioned flow cell. *Appl Environ Microbiol* 70:4340-4348
41. Gängler P, Arnold WH. Struktur und Funktion des Gebisses und der Mundhöhle. In: Gängler P, Hoffmann T, Willershausen B, Schwenzer N, Ehrenfeld M (Hrsg.). *Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie*. 2. Stuttgart / New York: Georg Thieme Verlag 2005; Kapitel 2:13-59
42. Gängler P, Arnold WH, Steinberg D. Zahnkaries- Grundlagen und Diagnostik; Ätiologie und Pathogenese. In: Gängler P, Hoffmann T, Willershausen B, Schwenzer N, Ehrenfeld M (Hrsg.). *Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie*. 112-136 Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2005:112-137
43. Gazzani G, Daglia M, Papetti A (2011) Food components with anticaries activity. *Curr Opin Biotechnol* 23:153-159
44. Gibson GR, Fuller R (2000) Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *J Nutr* 130:391S-395S
45. Gold OG, Jordan HV, Van Houte J (1973) A selective medium for streptococcus mutans. *Arch Oral Biol* 18:1357-1364
46. Grötz KA, Duschner H, Wagner W (1995) Histomorphologie radiierter Zahnhartgewebe im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM). Erste Mitteilungen. *Dtsch Zahnärztl Z* 50:653-657
47. Hahn R, Netuschil L, Löst C (1992) Initiale Plaquebesiedlung keramischer Restaurationmaterialien. *Dtsch Zahnärztl Z* 47:330-334
48. Hannig C, Follo M, Hellwig E, Al-Ahmad A (2010) Visualisation of adherent microorganisms using different techniques. *J Med Microbiol* 59:1-7
49. Hannig C, Hannig M (2009) The oral cavity--a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Investig* 13:123-139

50. Hannig C, Hannig M, Attin T (2005) Enzymes in the acquired enamel pellicle. *Eur J Oral Sci* 113:2-13
51. Hannig C, Spitzmuller B, Hannig M (2009) Characterisation of lysozyme activity in the in situ pellicle using a fluorimetric assay. *Clin Oral Investig* 13:15-21
52. Hannig M, Hannig C (2007) Der initiale orale Biofilm – pathogen oder protektiv? *Oral-prophylaxe & Kinderzahnheilkunde* 29:73-82
53. Hannig M, Joiner A (2006) The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci* 19:29-64
54. Hasslof P, Hedberg M, Twetman S, Stecksen-Blicks C (2010) Growth inhibition of oral mutans streptococci and candida by commercial probiotic lactobacilli--an in vitro study. *BMC Oral Health* 10:18
55. Haukioja A, Loimaranta V, Tenovu J (2008) Probiotic bacteria affect the composition of salivary pellicle and streptococcal adhesion in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 23:336-343
56. Haukioja A, Yli-Knuuttila H, Loimaranta V, Kari K, Ouwehand AC, Meurman JH, et al. (2006) Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 21:326-332
57. Hellwig E, Klimek J, Attin T. Ätiologie entzündlicher Parodontopathien. In: Hellwig E, Klimek J, Attin T (Hrsg.). Einführung in die Zahnerhaltung. 4. München-Jena: Urban & Fischer Verlag 2006a:371-390
58. Hellwig E, Klimek J, Attin T. Ätiologie, Histologie und Epidemiologie der Karies und anderer Zahnhartsubstanzdefekte. In: Hellwig E, Klimek J, Attin T (Hrsg.). Einführung in die Zahnerhaltung. 4. München - Jena: Urban & Fischer Verlag 2006b:13-63
59. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N (2009) Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res* 88:982-990
60. Jenkinson HF, Lamont RJ (1997) Streptococcal adhesion and colonization. *Crit Rev Oral Biol Med* 8:175-200
61. Jordan HV, Laraway R, Snirch R, Marmel M (1987) A simplified diagnostic system for cultural detection and enumeration of streptococcus mutans. *J Dent Res* 66:57-61

62. Keller MK, Hasslof P, Stecksén-Blicks C, Twetman S (2011) Co-aggregation and growth inhibition of probiotic lactobacilli and clinical isolates of mutans streptococci: an in vitro study. *Acta Odontol Scand* 69:263-268
63. Keyes PH (1968) Research in dental caries. *J Am Dent Assoc* 76:1357-1373
64. Kidd EA, Fejerskov O (2004) What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res* 83:35-38
65. Kitada K, Oho T (2012) Effect of saliva viscosity on the co-aggregation between oral streptococci and actinomyces naeslundii. *Gerodontology* 29:981-987
66. Klein MI, DeBaz L, Agidi S, Lee H, Xie G, Lin AH, et al. (2010) Dynamics of streptococcus mutans transcriptome in response to starch and sucrose during biofilm development. *PLoS One* 5:e13478
67. Kleinberg I (2002) A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: an alternative to streptococcus mutans and the specific-plaque hypothesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 13:108-125
68. Klimek J, Hellwig E. Kariesätiologie und -diagnose. In: Heidemann D (Hrsg.). *Praxis der Zahnheilkunde (Kariologie)*. 4. Auflage. München - Jena: Urban & Fischer Verlag 1999:3-42
69. Kolenbrander PE, Ganeshkumar N, Cassels J, Hughes CV (1993) Coaggregation: specific adherence among human oral plaque bacteria *FASEB J* 7:406-413
70. Kolenbrander PE, London J (1993) Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol* 175:3247-3252
71. König K. Karies und Kariesprophylaxe. München: Wilhelm Goldmann Verlag GmbH 1971
72. Koo H, Xiao J, Klein MI (2009) Extracellular polysaccharides matrix--an often forgotten virulence factor in oral biofilm research. *Int J Oral Sci* 1:229-234
73. Kretschmar K, Weber MT, Viergutz G, Hannig C (2011) Kariesprophylaxe mit Fluoriden bei Klein- und Vorschulkindern. *Dentalzeitung* 3:18-24
74. Laheij AM, van Strijp AJ, van Loveren C (2010) In situ remineralisation of enamel and dentin after the use of an amine fluoride mouthrinse in addition to twice daily brushings with amine fluoride toothpaste. *Caries Res* 44:260-266

75. Lang C, Bottner M, Holz C, Veen M, Ryser M, Reindl A, et al. (2010) Specific *Lactobacillus/Mutans Streptococcus* co-aggregation. *J Dent Res* 89:175-179
76. Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE (1991) Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol* 173:6558-6567
77. Lazar V (2011) Quorum sensing in biofilms - How to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? *Anaerobe* 17:280-285
78. Leal SC, Bittar J, Portugal A, Falcao DP, Faber J, Zanotta P (2010) Medication in elderly people: its influence on salivary pattern, signs and symptoms of dry mouth. *Gerodontology* 27:129-133
79. Lee BC, Jung GY, Kim DJ, Han JS (2011) Initial bacterial adhesion on resin, titanium and zirkonia in vitro. *J Adv Prosthodont* 3:81-84
80. Lie T (1977) Early dental plaque morphogenesis. *J Periodontal Res* 12:73-89
81. Lindquist B, Emilson CG (1991) Dental location of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in humans harboring both species. *Caries Res* 25:146-152
82. Lingström P, Van Houte J, Kashket S (2000) Food starches and dental caries. *Crit Rev Oral Biol Med* 11
83. Loe H, Theilade E, Jensen SB (1965) Experimental Gingivitis in Man. *J Periodontol* 36:177-187
84. Loesche WJ (1976) Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral sciences reviews* 9:65-107
85. Loesche WJ (1986) Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 50:353-380
86. Loesche WJ, Rowan J, Straffon LH, Loos PJ (1975) Association of *Streptococcus mutans* with human dental decay. *Infect Immun* 11:1252-1260
87. Marsh P, Martin MV. Die orale Residentmikroflora. *Orale Mikrobiologie*. 1. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2003a; Kapitel 3:20-38
88. Marsh P, Martin MV. Zahnkaries. *Orale Mikrobiologie*. 1. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2003b; Kapitel 6:95-121
89. Marsh PD (1994) Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 8:263-271

90. Masuda N, Tsutsumi N, Sobue S, Hamada S (1979) Longitudinal survey of the distribution of various serotypes of *Streptococcus mutans* in infants. *J Clin Microbiol* 10:497-502
91. Matsui R, Cvitkovitch D (2010) Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. *Future Microbiol* 5:403-417
92. McConell MD, Liu Y, Nowak AP, Pilch S, Masters JG, Composto RJ (2010) Bacterial plaque retention on oral hard materials: effect of surface roughness, surface composition, and physisorbed polycarboxylate. *J Biomed Mater Res A* 92:1518-1527
93. Meurman JH (2005) Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? *Eur J Oral Sci* 113:188-196
94. Meurman JH, Stamatova I (2007) Probiotics: contributions to oral health. *Oral Dis* 13:443-451
95. Meyerowitz C, Featherstone JDB, Billings RJ, Eisenberg AD, Fu J, Shariati M, et al. (1991) Use of an intra-oral model to evaluate 0,05% sodium fluoride mouthrinse mouthrinse in radiation-induced hyposalivation. *J Dent Res* 70:894-898
96. Miller MB, Bassler BL (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55:165-199
97. Miller WD. *Die Mikroorganismen der Mundhöhle*. 2. Leipzig: Georg Thieme Verlag 1892
98. Montalto M, Vastola M, Marigo L, Covino M, Graziosetto R, Curigliano V, et al. (2004) Probiotic treatment increases salivary counts of lactobacilli: a double blind, randomized, controlled study. *Digestion* 69:53-56
99. Nase L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Ponka A, Poussa T, et al. (2001) Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Res* 35:412-420
100. Netuschil L, Reich E, Unteregger G, Sculean A, Brex M (1998) A pilot study of confocal laser scanning microscopy for the assessment of undisturbed dental plaque vitality and topography. *Arch Oral Biol* 43:277-285
101. Netuschil L, Von Ohle C, Brex M (1996) Die Vitalfluoreszenztechnik in der Plaqueforschung. *Parodontol* 7:293-305

102. Nikawa H, Makihira S, Fukushima H, Nishimura H, Ozaki Y, Ishida K, et al. (2004) *Lactobacillus reuteri* in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci. *Int J Food Microbiol* 95:219-223
103. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA (2006) The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. *J Dent Res* 85:878-887
104. Pessan JP, Al-Ibrahim NS, Buzalaf MAR, Toumba KJ (2008) Slow-release fluoride devices: a literature review. *J Appl Oral Sci* 16:238-244
105. Pieralisi FJS, Rodrigues MR, Segura VG, Maciel SM, Ferreira FBA, Garcia JE, et al. (2010) Genotypic diversity of streptococcus mutans in caries-free and caries-active pre-school children. *Int J Dent* 824976
106. Quirynen M (1994) The clinical meaning of the surface roughness and the surface free energy of intra-oral hard substrata on the microbiology of the supra- and subgingival plaque: results of in vitro and in vivo experiments. *J Dent* 22 Suppl 1:S13-16
107. Quirynen M, Bollen C (1995) The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. *J Clin Periodontol* 22:1-14
108. Rastogi P, Saini H, Dixit J, Singhal R (2011) Probiotics and oral health. *Natl J Maxillofac Surg* 2:6-9
109. Rosan B, Lamont R (2000) Dental plaque formation. *Microbes Infect* 2:1599-1607
110. Roulet JF. Ernährung und Ernährungslenkung. In: Rateitschak KH, Wolf HF (Hrsg.). *Farbatlanten der Zahnmedizin (Prophylaxe und Präventivzahnmedizin)*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2003:39-46
111. Rupf S, Kneist S, Merte K, Eschrich K (1999a) Quantitative determination of *Streptococcus mutans* by using competitive polymerase chain reaction. *Eur J Oral Sci* 107:75-81
112. Rupf S, Merte K, Eschrich K (1999b) Quantification of bacteria in oral samples by competitive polymerase chain reaction. *J Dent Res* 78:850-856
113. Sanderink R, Weber C. Plaque und Zahnstein. In: Sanderink RBA, Bernhardt H, Knoke M, Meyer J, Weber C, Weiger R (Hrsg.). *Orale Mikrobiologie und Immunologie*. Berlin: Quintessenz Verlags-GmbH 2004:301-314

- 114.Sanderink R, Weiger R. Die infizierte Zahnhartsubstanz. In: Sanderink RBA, Bernhardt H, Knoke M, Meyer J, Weber C, Weiger R (Hrsg.). Orale Mikrobiologie und Immunologie Berlin: Quintessenz Verlags-GmbH 2004:321-355
- 115.Sanderink R, Zitzmann NU, Saxer UP, Schlagenhaut U, Persson R, Erne P (2008) Parodontitis und Periimplantitis: in den menschlichen Körper disseminierende Biofilm-Infekte. Quintessenz 59:273-285
- 116.Scannapieco FA (1994) Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. Crit Rev Oral Biol Med 5:203-248
- 117.Seemann R. Plaque. In: Rateitschak KH, Wolf HF (Hrsg.). Farbatlanten der Zahnmedizin: Prophylaxe und Präventivzahnmedizin. 1. Stuttgart: Thieme Verlag 2003:34-38
- 118.Sreenivasan PK, Furgang D, Markowitz K, McKiernan M, Tischio-Bereski D, Devizio W, et al. (2009) Clinical anti-microbial efficacy of a new zinc citrate dentifrice. Clin Oral Investig 13:195-202
- 119.Stamatova I, Meurman JH (2009) Probiotics: health benefits in the mouth. Am J Dent 22:329-338
- 120.Takahashi N, Nyvad B (2008) Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. Caries Res 42:409-418
- 121.Takahashi N, Nyvad B (2011) The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. J Dent Res 90:294-303
- 122.Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM (2001) The microbiology of primary dental caries in humans. J Dent Educ 65:1028-1037
- 123.Tanzer JM, Thompson A, Lang C, Cooper B, Hareng L, Gamer A, et al. (2010) Caries inhibition by and safety of Lactobacillus paracasei DSMZ16671. J Dent Res 89:921-926
- 124.Tawakoli PN, Al-Ahmad A, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C (2012) Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm. Clin Oral Investig DOI 10.1007/s00784-012-0792-3
- 125.Tonetti MS, Lang NP, P. C, Suvan JE, Eickholz P, Fourmouis I, et al. (2012) Effects of a single topical doxycycline administration adjunctive to mechanical debridement in patients with persistent/recurrent periodontitis but acceptable oral hygiene during supportive periodontal therapy. J Clin Periodontol 39:475-482

126. Twetman S, Keller MK (2012) Probiotics for caries prevention and control. *Adv Dent Res* 24:98-102
127. Twetman S, Stecksén-Blicks C (2008) Probiotics and oral health effects in children. *Int J Paediatr Dent* 18:3-10
128. Van Houte J (1980) Bacterial specificity in the etiology of dental caries. *Int dent J* 30:305-326
129. Van Houte J (1994) Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res* 73:672-681
130. Van Houte J, Green DB (1974) Relationship between the concentration of bacteria in saliva and the colonization of teeth in humans. *Infect Immun* 9:624-630
131. Vassilakos N, Arnebrant T, Glantz PO (1993) An in vitro study of salivary film formation at solid/liquid interfaces. *Scand J Dent Res* 101:133-137
132. Vickerman M, Clewell D, Jones G (1991) Sucrose-promoted accumulation of growing glucosyltransferase variants of *Streptococcus gordonii* on hydroxyapatite surfaces. *Infect Immun* 59:3523-3530
133. Watnick P, Kolter R (2000) Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* 182:2675-2679
134. Wimpenny JW (1982) Responses of microorganisms to physical and chemical gradients. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 297:497-515

7 Danksagung

Meinem Doktorvater, Professor Dr. Stefan Rupf, Oberarzt der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes, danke ich für die freundliche Bereitstellung des Themas sowie für die stets konstruktiven Hinweise und Ratschläge in sämtlichen Phasen der Arbeit.

Dem Projektleiter, Professor Dr. Matthias Hannig, Direktor der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes, danke ich für seine stete Bereitschaft, schwierige Fragestellungen und Sachverhalte zu diskutieren.

Ein besonderer, liebevoller Dank gilt meiner Lebensgefährtin, Frau Dr. Melanie Chapat. Mit ihrer Hilfe und ihrer tatkräftigen Unterstützung, vor allem in der Planung und Durchführung der klinischen Studie sowie ihrem steten moralischen Beistand, war es möglich, dieses große Dissertationsprojekt abzuschließen.

Meinem Vater, Dr. Thomas Rehage danke ich herzlich für seine fachliche Unterstützung sowie die inhaltliche und vor allem die grammatikalische Korrektur meiner Niederschrift.

Ich danke meinen Eltern und damit meiner ganzen Familie, dass sie es mir ermöglichten, das Fach Zahnheilkunde zu studieren. Ohne ihre Hilfe und fortwährende Unterstützung wäre der Grundstein dieser Arbeit, die Approbation als Zahnarzt, nicht möglich gewesen.

Thomas Kirsch danke ich für seine freundschaftliche Unterstützung im Layout und Druck der Arbeit. Sebastian Mayer danke ich für seine Hilfe bei der Herstellung der grafischen Darstellung des Biofilms.

Meinen Probanden danke ich für ihre zuverlässige Teilnahme an der Durchführung der klinischen Untersuchungen.

8 Lebenslauf

Benjamin Rehage, geboren am 25.06.1980 in Münster/Westfalen,

wohnhaft in der Kirkeler Straße 2, 66424 Homburg/Saar

Eltern: Heike Rehage, geb. Stader, (Lehrerin), und Dr. Thomas Rehage (Zahnarzt)

Geschwister: Judith (geb. 15.08.1985) und Hannah (geb. 28.12.1986)

Schulische Bildung:

1986 – 1990 Städtische Gemeinschaftsgrundschule Marper Schulweg, Wuppertal

1990 – 2000 Städtisches Gymnasium am Kothen, Wuppertal

Juni 2000 Allgemeine Hochschulreife

Berufliche Ausbildung:

Oktober 2000 – Januar 2003

Ausbildung zum Zahntechniker, Dentallabor Frank Schwarz Dentaltechnik, Bochum

Januar 2003 Gesellenprüfung im Zahntechnikerhandwerk, Hagen

Februar 2003 – September 2003

Aufbau eines Praxislabors in der Gemeinschaftspraxis Dres Rehage, Wuppertal

Oktober 2003 – Dezember 2009

Studium der Zahnheilkunde an den Universitätskliniken Homburg/Saar

Dezember 2009 zahnärztliche Prüfung

Januar 2010 – März 2010

Hospitationen in allgemein Zahnärztlicher, kieferchirurgischer sowie kieferorthopädischer Praxis (Dres Rehage, Arens und Kieser, Wuppertal)

April 2010 – Oktober 2010

Tätigkeit als Assistenz Zahnarzt in der Praxis für Zahngesundheit Mathias Ecker, Saarbrücken

November 2010 – heute

Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde an den Universitätskliniken Homburg/Saar

Sprachkenntnisse: Deutsch, Französisch und Englisch